

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

Mecanismos reguladores implicados en la regulación entre receptores
opioide mu-cannabinoide CB1 y glutamatérgico NMD

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Vicente Sánchez

Directores

Javier Garzón
María del Pilar Sánchez
Juan Carlos Leza

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



**MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA
REGULACIÓN ENTRE RECEPTORES OPIOIDE
MU/CANNABINOIDE CB1
Y GLUTAMATÉRGICO NMDA**

Ana Vicente Sánchez

Madrid, Marzo de 2012

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología

***Mecanismos moleculares implicados en la regulación entre receptores
opioide Mu/cannabinoide CB1 y glutamatérgico NMDA***

VºBº Director

VºBº Director

VºBº Director

Fdo. Javier Garzón Fdo. Pilar Sánchez Fdo. Juan Carlos Leza



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



D. JAVIER GARZÓN NIÑO, INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL C.S.I.C. Y JEFE
DEL LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA DEL INSTITUTO CAJAL,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “MECANISMOS MOLECULARES
IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN ENTRE RECEPTORES OPIOIDE
MU/CANNABINOIDE CB1 Y GLUTAMATÉRGICO NMDA” ha sido realizado por
Dña. Ana Vicente Sánchez en el Laboratorio de Neurofarmacología de este Instituto
bajo mi dirección, para optar al grado de Doctora en Ciencias Biomédicas por la
Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste donde proceda se firma este certificado, en
de de 2012.

a

Fdo.: Dr. Javier Garzón Niño

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con la ayuda económica de una beca de investigación predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI), concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia durante los años 2007-2011.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecer al Dr. Garzón y a la Dra. Sánchez Blázquez la oportunidad de unirme a su grupo de investigación y de realizar esta Tesis Doctoral. Gracias por vuestros consejos y ayuda durante estos años. Pilar, quiero agradecerte especialmente tu orientación y apoyo desde el primer momento en que llegué al laboratorio, con muchísimas ganas de aprender aunque un poco despistada. Agradecer también al Dr. Leza su colaboración al actuar como tutor ante el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la U.C.M.

Gracias a todas mis compañeras del laboratorio de Neurofarmacología, las que están todavía y las que cambiaron de rumbo, con las que he compartido esta experiencia y he convivido día a día. En especial a María, por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de este trabajo. Gracias por estar siempre disponible para responder mis innumerables preguntas. A mis otros compañeros y amigos del Instituto Cajal, Javier, Oscar, Rubén, Alex, Albert, Héctor y Anahí, por todas las veces que nos hemos reído juntos, gracias por estar ahí. Esta etapa sin vosotros no hubiera sido lo mismo, sólo espero que detrás de esta vengan otras mejores y que podamos seguir viéndonos para contarnos las novedades (aunque a veces algún navarro nos sorprenda más de la cuenta, je je).

A Andrés, la persona que más tiempo ha tenido que soportarme durante la fase de escritura de esta Tesis, ¡me sorprende que no hayas salido corriendo!. Gracias por estar siempre presente, apoyándome y animándome todos los días, aunque muchas veces no haya sido fácil. No te preocupes, ahora te puedes vengar cuando te pongas a escribir la tuya (mejor será no dar ideas...).

Y finalmente quisiera dar las gracias de corazón a mis padres, que desde pequeña me han enseñado el valor de la constancia y la perseverancia, que tan importante es en la investigación. Gracias por interesaros en mi trabajo y estar siempre dispuestos a escuchar mis progresos y dificultades. Este también es vuestro premio.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS	3
2. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G (GPCRs):	5
2.1. Receptores opioides	11
2.1.1. Sistema opioide endógeno	11
2.1.2. Descubrimiento de los receptores opioides: tipos y subtipos	13
2.1.3. Distribución y localización anatómica	15
2.1.4. Efectos farmacológicos de la activación de receptores opioides: analgesia	16
2.1.5. Señalización opioide	18
2.1.6. Mecanismos de regulación de la señalización de receptores opioides: desensibilización y tolerancia	18
2.2. Receptores cannabinoides	21
2.2.1. Sistema cannabinoide endógeno	21
2.2.2. Receptores cannabinoides	22
2.2.3. Distribución y localización anatómica	24
2.2.4. Efectos farmacológicos de la activación de receptores cannabinoides: analgesia	25
2.2.5. Señalización cannabinoide	26
2.2.6. Mecanismos de regulación de la señalización de receptores cannabinoides: desensibilización y tolerancia	27
3. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NMDA:	30
3.1. Receptores de NMDA	31
3.1.1. Estructura	33
3.1.2. Propiedades biofísicas	34
3.1.3. Distribución y localización anatómica	35
3.1.4. Complejos multiproteicos de NMDARs	36
3.1.5. Regulación entre GPCRs y NMDARs	39
4. PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN CRUZADA ENTRE GPCRs Y NMDARs	43
4.1. HINT1	43
4.2. RGSZ2	45

II. OBJETIVOS	49
III. MATERIAL Y MÉTODOS	55
1. Materiales	57
1.1. Animales de experimentación	57
1.1.1. Genotipado de ratones 129/SvJ	57
1.2. Anticuerpos empleados en el estudio	58
1.3. Drogas y fármacos	61
1.4. Diseño y síntesis de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs)	61
1.5. Diseño y síntesis de cebadores o <i>primers</i>	62
1.6. Cultivos celulares	64
1.6.1. Cultivo primario enriquecido en astrocitos corticales tipo I	64
1.6.2. Mantenimiento de línea celular CHO	65
2. Métodos	66
2.1. Estudio de la actividad motora espontánea: test del campo abierto	66
2.2. Administración intracerebroventricular	66
2.2.1. Administración icv de oligodeoxinucleótidos antisentido	67
2.3. Medida del efecto analgésico: test de retirada de la cola	67
2.4. Desarrollo de tolerancia aguda en el ratón	68
2.5. Ensayos de inmunoprecipitación	69
2.5.1. Obtención y preparación de las muestras	69
2.5.2. Inmunoprecipitación de proteínas	69
2.6. Electroforesis de proteínas y transferencia a soporte sólido: detección inmunológica (<i>western-blot</i>)	71
2.7. Producción de proteínas recombinantes	72
2.7.1. Obtención de ADN complementario como molde para PCR	72
2.7.2. Clonaje	73
2.7.3. Transformación y análisis de clones	76
2.7.4. Expresión	77
2.7.5. Purificación	77
2.7.6. Corte proteolítico con la proteasa TEV	79
2.8. Ensayos de interacción <i>in vitro</i> de proteínas recombinantes (<i>pull down</i>)	80
2.9. Ensayos de fosforilación de proteínas recombinantes	81
2.10. Resonancia de plasmón superficial (SPR)	81
2.11. Ensayos de fluorescencia de complementación bimolecular (BiFC)	83
2.11.1. Clonaje para BiFC	84

2.11.2. Transfección	84
2.11.3. Detección de las señales fluorescentes	85
2.12. Inmunocitoquímica	85
2.12.1. Marcaje intracelular de CB1R en astrocitos corticales	85
2.12.2. Marcaje en superficie de CB1R en astrocitos corticales	86
III. RESULTADOS	87
1. Asociación GPCRs-NMDAR en tejido neural de ratón	89
1.1. Interacción física directa MOR-NMDAR: implicación de su secuencia C-terminal	89
1.1.1. Efecto de la morfina en la asociación entre MOR y NR1	93
1.1.2. Papel de la PKC en la interacción entre MOR y NMDAR	96
1.2. Interacción física directa CB1R-NMDAR: implicación de su secuencia C-terminal	97
1.2.1. Efecto de WIN55.212-2 en la asociación entre CB1R y NR1	100
1.2.1.1. WIN55.212-2 induce la internalización del CB1R	100
1.2.1.2. WIN55.212-2 estimula la internalización de los CB1Rs. Efecto sobre su asociación con las subunidades NR1 del NMDAR	103
1.2.1.3. Efecto del MK-801 en la internalización del CB1R mediada por WIN55.212-2	104
1.2.1.4. WIN55.212-2 estimula la internalización de las subunidades NR1 asociadas al CB1R	106
2. El módulo HINT1-RGSZ2 en la asociación entre GPCRs y NMDAR	107
2.1. La proteína HINT1 existe como un homodímero en la célula	107
2.1.1. El homodímero de HINT1 interacciona directamente con RGSZ2	108
2.1.2. Papel de la PKC en la interacción entre HINT1 y RGSZ2	110
2.2. Interacción del extremo C-terminal del MOR con el módulo HINT1-RGSZ2	112
2.2.1. Interacción física directa del extremo C-terminal del MOR con HINT1	113
2.2.2. RGSZ2 no se une directamente a la región C-terminal del MOR	114
2.2.3. Estabilidad de la asociación del MOR con el módulo HINT1-RGSZ2 <i>in vivo</i>	115

2.3. Interacción del extremo C-terminal del CB1R con el módulo de señalización HINT1-RGSZ2	117
2.3.1. Estabilidad de la asociación del CB1R con el módulo HINT1-RGSZ2	119
2.3.2. HINT1 participa en la conexión molecular entre CB1R y NMDAR	121
3. Asociación del NMDAR con proteínas del entorno de los GPCRs: HINT1 y RGSZ2	122
4. Estudio conductual en el ratón	122
4.1. Actividad motora espontánea	123
4.2. Analgesia y tolerancia producidas por el agonista cannabinoide WIN55.212-2	125
4.2.1. Papel de la RGSZ2 en la analgesia y tolerancia cannabinoide	128
4.2.2. Efecto del MK-801 en la analgesia y tolerancia inducidas por WIN55.212-2	129
IV. DISCUSIÓN	133
1. Asociación de MOR y CB1R con el NMDAR en PAG	136
2. Asociación de MOR y CB1R con el módulo de señalización HINT1-RGSZ2	139
3. Efecto de la morfina en la dinámica de asociación MOR-NMDAR. Papel de la PKC en la disociación del complejo	144
4. Efecto del WIN55.212-2 en la dinámica de asociación CB1R-NMDAR	148
5. Influencia de la asociación CB1R-NMDAR en la respuesta analgésica a WIN55.212-2. Papel de la proteína HINT1	152
V. CONCLUSIONES	157
VI. BIBLIOGRAFÍA	161
VII. PUBLICACIONES	199

ABREVIATURAS

AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AKAP	<u>A</u> <u>K</u> inase <u>A</u> nchoring <u>P</u> rotein (proteína de anclaje de la quinasa A)
BiFC	<u>B</u> imolecular <u>F</u> luorescence <u>C</u> omplementation (complementación bimolecular por fluorescencia)
BRET	<u>B</u> ioluminiscence <u>R</u> esonance <u>E</u> nergy <u>T</u> ransfer (bioluminiscencia por transferencia de energía resonante)
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine (albúmina de suero bovino)
CaM	calmodulina
CaMKII	proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
CB1R	receptor cannabinoide tipo 1
CB2R	receptor cannabinoide tipo 2
ADNc	ácido deoxirribonucleico complementario
CHO	<u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>O</u> vary (ovario de hámster chino)
DAG	diacilglicerol
DAMGO	[D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol ⁵]-encefalina
DOR	receptor opioide Delta
D1R	receptor dopaminérgico 1
EAM	efecto analgésico máximo
ESM	error estándar de la media
GAP	<u>G</u> TPase <u>A</u> ctivating <u>P</u> rotein (proteína activadora de GTPasa)
GDP	guanosín difosfato
GPCR	<u>G</u> <u>P</u> rotein <u>C</u> oupled <u>R</u> eceptor (receptor acoplado a proteína G)
GRK	<u>G</u> <u>p</u> rotein <u>R</u> eceptor <u>K</u> inase (proteína quinasa de receptores G)
GST	glutación-S-transferasa
GTP	guanosín trifosfato
GTPγS	análogo no hidrolizable del GTP
HINT1	<u>H</u> istidine triad <u>N</u> ucleo <u>T</u> ide-binding protein <u>1</u>
icv	intracerebroventricular
IP3	inositol 3,4,5-trifosfato
KD	<u>K</u> nock- <u>D</u> own
KDa	Kilodalton
KO	<u>K</u> nock- <u>O</u> ut
KOR	receptor opioide Kappa
MAPK	<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase (proteína quinasa activada por mitógenos)

MAGUK	<i>Membrane-Associated Guanylate Kinases</i> (guanilato quinasas asociadas a membrana)
mGluR	receptor metabotrópico de glutamato
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
MOR	receptor opioide Mu
NMDAR	receptor de N-metil-D-aspartato
nNOS	<i>neural Nitric Oxide Synthase</i> (óxido nítrico sintasa neural)
NO	óxido nítrico
NRTK	<i>Non-Receptor Tyrosine Kinase</i> (proteína tirosina quinasa no receptorial)
ODN	oligodeoxinucleótido
PAG	<i>PeriAqueductal Grey matter</i> (sustancia gris periacueductal)
PDZ	<i>Postsynaptic density-95/Discs large/Zonula occludens-1-binding motif</i>
PhLP	<i>Phosducin-Like Protein</i> (proteína tipo fosducina)
PI3K	fosfoinositol 3-quinasa
PKA	proteína quinasa A
PKB/Akt	proteína quinasa B
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
PP1	<i>Protein Phosphatase 1</i> (proteína fosfatasa 1)
PSD	<i>PostSynaptic Density</i> (densidad postsináptica)
PSD-95	proteína de densidad postsináptica 95
PTX	<i>Pertussis Toxin</i> (toxina pertússica)
RGS	<i>Regulator of G protein Signaling</i> (regulador de la señalización de las proteínas G)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (dodecilsulfato de sodio)
SDS-PAGE	<i>SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS)
SNC	sistema nervioso central
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (resonancia de plasmón superficial)
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like MOdifiers</i> (modificadores tipo ubiquitina de pequeño tamaño)
THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
WIN55.212-2	(R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrol[1,2,3-de)-1,4-benzoxazin-6-il]-1-naftalenilmetadona
WT	<i>Wild-Type</i>

Introducción

1. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

Mediante su papel en la comunicación neural, transmisión sináptica y transináptica, los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) juegan un papel esencial en la homeostasis del sistema nervioso central (SNC), influyen en su funcionamiento normal y patológico y constituyen una de las principales dianas de fármacos dirigidos a regular las funciones más diversas. A esto se añade que algunas sustancias adictivas así como agentes neurotóxicos utilizan GPCRs para ejercer sus efectos negativos. Estas circunstancias hacen que se investigue en profundidad las propiedades de estos receptores con la finalidad de relacionarlos con las disfunciones en las que estén implicados y así aplicar eficazmente las aproximaciones terapéuticas correspondientes. Es en este marco de los GPCRs neurales donde se centra este trabajo de Tesis Doctoral; el receptor opioide Mu (MOR) y el receptor cannabinoide CB1 (CB1R), así como su regulación por el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR) son el objetivo principal de este estudio.

Los opioides/opiáceos son sin duda los analgésicos más eficaces en clínica para el tratamiento del dolor. Es bien conocido que la administración repetida de opiáceos, como morfina o heroína, producen una disminución progresiva de su potencia, y este desarrollo de tolerancia implica que serán necesarias cada vez mayores cantidades de estos compuestos para conseguir un mismo efecto. Esto no solo contribuye a la aparición de efectos secundarios indeseables (depresión respiratoria, alteraciones cognitivas,...), sino que incrementa la vulnerabilidad a los efectos adictivos asociados al consumo terapéutico o recreacional (abuso) de los opiáceos. El modelo clásico de tolerancia/desensibilización de los GPCRs se ha asociado a la internalización y fosforilación del receptor por distintas quinasas. Sin embargo, dado que por sus características el MOR internalizado no se destruye sino que se recicla rápidamente a la membrana, la endocitosis del MOR se considera actualmente un proceso de resensibilización más que de desensibilización. Alternativamente, la desensibilización a este opiáceo se logra mediante el desacoplamiento del receptor de su transducción inmediata, las proteínas G. Es de destacar que el secuestro de la transducción regulada por el MOR requiere que se produzca un aumento de la actividad del NMDAR y la activación de varias quinasas (CaMKII, PKC, Src). Esto nos sugiere que los agonistas del MOR desencadenan la

activación de un sistema anti-opioide endógeno en el que participaría de forma decisiva el sistema glutamatérgico, en particular el NMDAR, donde convergen múltiples vías de señalización y que es regulado y a su vez regula la función de quinasas y fosfatasa. Esta idea está avalada por una extensa bibliografía que relaciona, principalmente a nivel funcional, el NMDAR con el sistema opioide y justificaría la ventaja que se obtiene en ciertos protocolos al asociar opioides con bloqueantes del NMDAR. El mecanismo molecular responsable de la activación de los receptores NMDA vía MOR no está aún bien definido. Los datos indican que de forma similar a lo descrito para otros receptores acoplados a proteínas G, participan serina/treonina quinasas tipo PKCs y las tirosina quinasas de la familia de la Src. Este proceso tendría como objetivo la fosforilación de residuos específicos de serina/treonina de las regiones citosólicas de las subunidades NR1 y NR2 del NMDAR, y de residuos de tirosina localizados en la región citoplasmática de las subunidades NR2A/B del receptor de NMDA.

Es gratificante poder constatar que la investigación de los mecanismos implicados en la tolerancia opioide ha avanzado de forma sustancial en los últimos años. Los resultados de los grupos punteros en esta investigación han demostrado que en las neuronas actúan mecanismos específicos para controlar de forma eficaz la señalización de los receptores en el SNC, y así se ha logrado identificar un cierto número de las proteínas que son esenciales en esta regulación. En el presente estudio continuaremos con la identificación de proteínas implicadas en la desensibilización del MOR y CB1R, con objeto de ensamblarlas como piezas de una maquinaria común que nos permita comprender en su conjunto los aspectos esenciales de su funcionamiento. Desde esta comprensión será más fácil proponer actuaciones más eficaces dirigidas a optimizar el uso terapéutico de los distintos fármacos/compuestos activos.

En los siguientes apartados de esta introducción trataremos aquellos aspectos de los receptores MOR, CB1R y NMDAR que consideramos más relevantes para el desarrollo de este estudio.

2. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs)

Los GPCRs constituyen una de las mayores familias de proteínas existentes en la naturaleza. Son fundamentales en la comunicación entre el medio extracelular y el interior de la célula. Su especificidad es tal que son capaces de discriminar entre la gran variedad de señales extracelulares aquellas para las que están diseñados. Estos receptores responden a una amplia diversidad de ligandos tanto endógenos (hormonas, neurotransmisores peptídicos, aminas, factores de crecimiento) como exógenos (fármacos, drogas, toxinas) (Marinissen y Gutkind, 2001). Son moléculas lineales transmembrana que llevan a cabo la mayoría de sus acciones intracelulares a través de rutas de señalización que implican la activación inicial de proteínas G. Su topología de membrana es común, y se caracteriza por la presencia de un extremo amino extracelular, un extremo carboxilo intracelular y siete hélices transmembrana (TM1-TM7) conectadas por bucles. Las secuencias aminoacídicas de estos receptores G comparten un 60 % de identidad, siendo las regiones transmembranales las zonas más conservadas (73-76 % de homología) y las extracelulares las de mayor variabilidad (34-40 % de identidad) (figura 1).

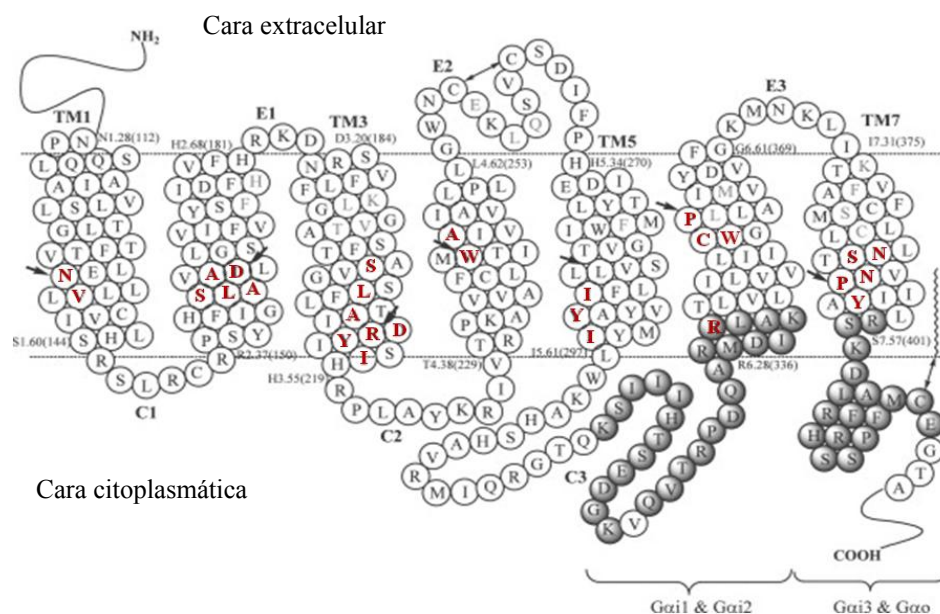


Figura 1. Estructura bidimensional del receptor CB1 humano. Se indican el extremo amino, las regiones transmembrana TM1-TM7, los bucles extracelulares E1-E3, los bucles citosólicos C1-C3 y el extremo carboxilo. En color gris se muestran las zonas de interacción con las subunidades Gα. En rojo señalamos los residuos más conservados de las regiones transmembrana entre los miembros de la familia de receptores semejantes a rodopsina; entre ellos, los altamente conservados se señalan con una flecha. En el E2 indicamos la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas 257 y 264. *Adaptado de (Mukhopadhyay y col., 2002).*

En estado basal, los GPCRs se encuentran asociados a proteínas G heterotriméricas, compuestas por una subunidad $G\alpha$ unida a guanosín difosfato (GDP), que es la que se acopla al receptor G, y un dímero $G\beta\gamma$ unido a la subunidad $G\alpha$. Por el momento, se han identificado 23 proteínas $G\alpha$, 5 $G\beta$ y 12 $G\gamma$ (Simon y col., 1991). De esto se podría deducir la existencia de muchas combinaciones de heterotrímeros, sin embargo, parecen existir una serie de combinaciones preferidas limitándose así el número de posibles formaciones (Robillard y col., 2000; Albert y Robillard, 2002). Las subunidades $G\alpha$ son proteínas de 39-52 KDa formadas por dos dominios: un dominio Ras o dominio GTPasa, común a todas las proteínas de la familia de las GTPasas, que lleva a cabo la hidrólisis de nucleótidos de guanina; y un dominio helicoidal de mayor variabilidad. Se clasifican en cuatro grupos en función de la similitud entre sus secuencias: *Gas*, que incluye *Gas* y *Gaolf*; *Gai*, que agrupa las subunidades *Gai1/i2/i3*, *Gao*, *Gat* y *Gaz*; *Gaq*, que incluye *Gaq*, *Ga11*, *Ga14* y *Ga16*; y *Ga12*, que comprende las proteínas *Ga12* y *Ga13* (Simon y col., 1991). La subunidad $G\beta$ tiene un peso molecular de 36 KDa y adopta una forma cilíndrica de hélice β integrada por siete láminas, que dejan en el centro de la hélice un poro. Las subunidades $G\gamma$ presentan un peso molecular de 6-9 KDa y su estructura es casi lineal, a excepción de su extremo amino-terminal helicoidal. La asociación de la $G\alpha$ -GDP con el heterodímero $G\beta\gamma$ facilita la localización de las $G\alpha$ en la membrana plasmática (Evanko y col., 2001) y disminuye la tasa de liberación espontánea de GDP, actuando como inhibidor de la disociación del nucleótido de guanina.

Como se describe en la figura 2, la unión de un estímulo extracelular al receptor actúa como factor de disociación de guanina promoviendo un cambio conformacional que permite la liberación del GDP de la $G\alpha$ (paso 2). La unión del guanosín trifosfato (GTP) a la $G\alpha$ desestabiliza el complejo permitiendo que la subunidad $G\alpha$ -GTP por un lado y el dímero $G\beta\gamma$ por otro puedan unirse a sus efectores (paso 3), entre los que se encuentran adenilato ciclasas (AC), guanilato ciclasas, fosfodiesterasas, canales de K^+ , canales de Ca^{2+} , fosfolipasa A2, fosfolipasa C, fosfoinosítido 3-quinasa, etc. La regulación de los efectores provoca la activación o inhibición de gran variedad de segundos mensajeros como el adenosín monofosfato cíclico (AMPC), guanosín monofosfato cíclico, diacilglicerol (DAG), inositol 3,4,5-trifosfato (IP3), ácido araquidónico y ácido

fosfatídico. La señalización termina con la hidrólisis del GTP a GDP por la $G\alpha$, que puede ser catalizada por un regulador de la señalización de proteínas G (RGS) (paso 4).

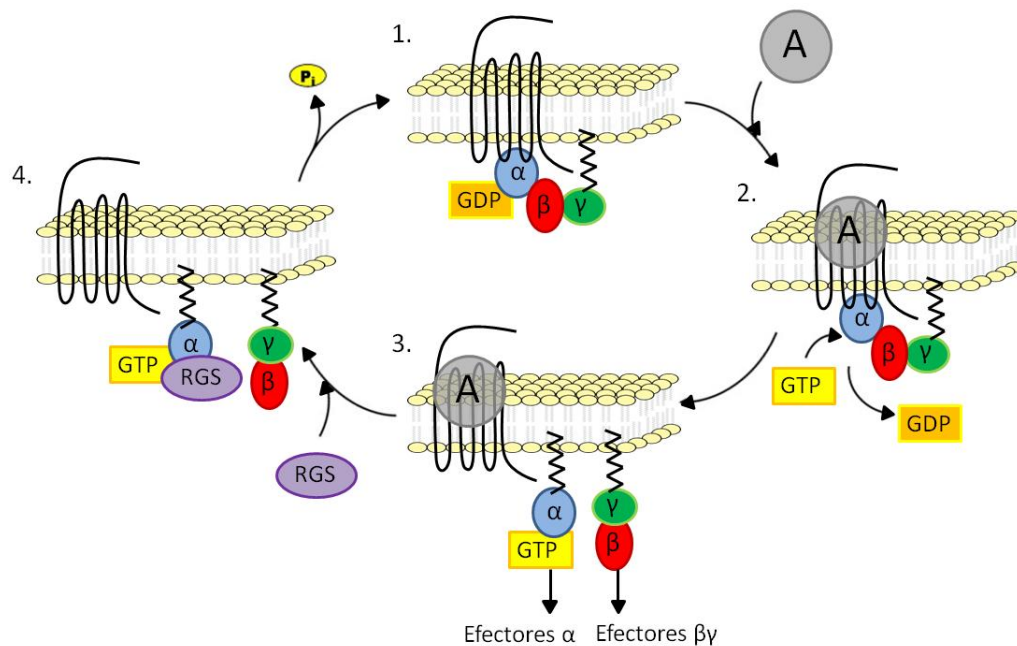
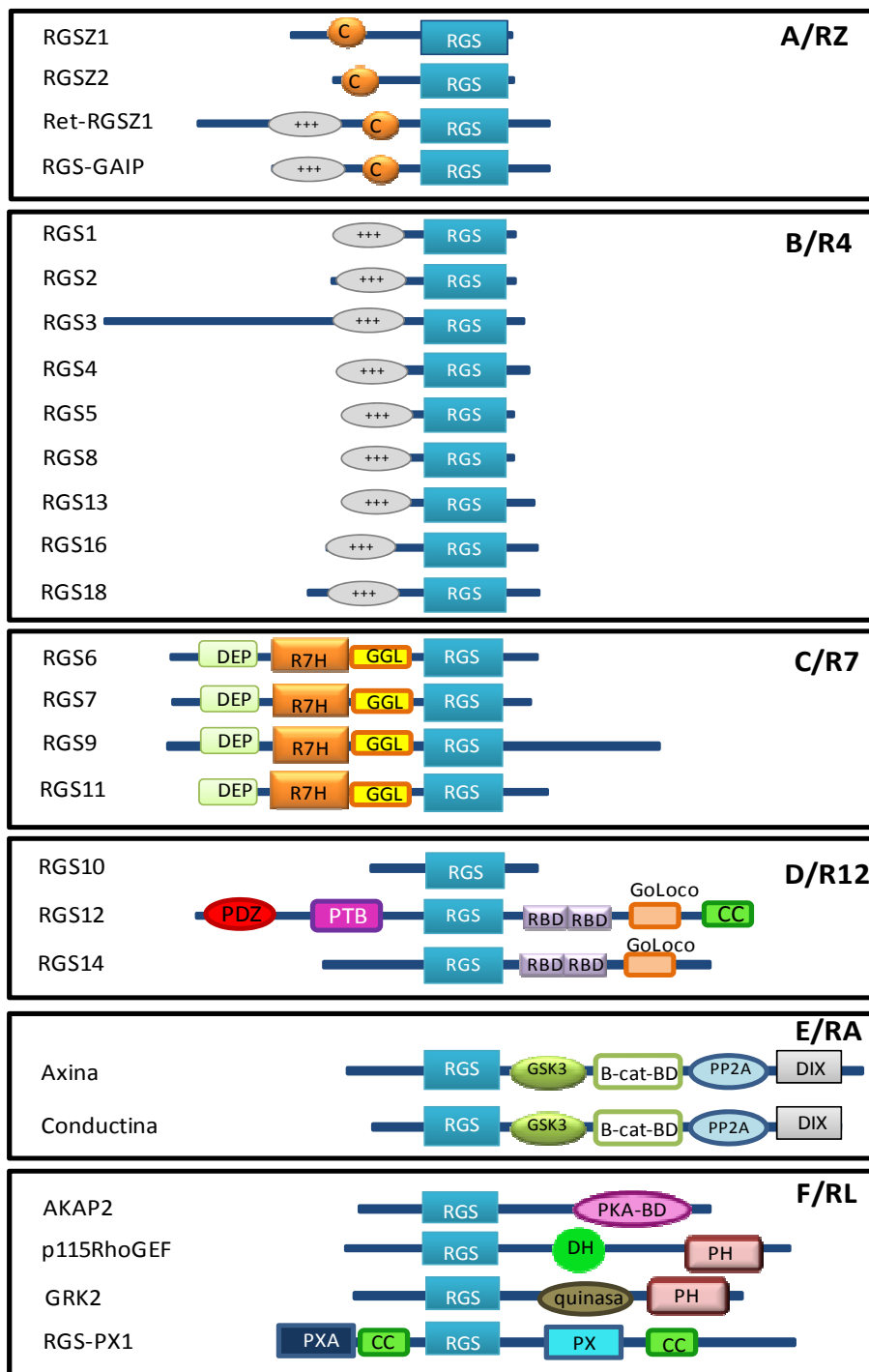



Figura 2. Ciclo de activación/desactivación de las proteínas G. El agonista se representa con un círculo gris y una A.

Las RGS constituyen una gran familia de proteínas identificadas inicialmente por su capacidad de activar la función GTPásica (GAP) de las subunidades $G\alpha$ de los GPCRs. Su capacidad GAP está mediada por una región altamente conservada de aproximadamente 120 aminoácidos, conocida como dominio o caja RGS. Desde el descubrimiento de la primera proteína RGS de mamífero se han descrito más de 30 proteínas que contienen dominios RGS o tipo-RGS. Estas proteínas se han agrupado en nueve subfamilias: RZ/A, R4/B, R7/C, R12/D, RA/E, GEF/F, GRK/G, SNX/H y D-AKAP2 (Neubig, 2002) en función de la secuencia aminoacídica de sus dominios RGS. A parte de la caja RGS, estas proteínas reguladoras poseen dominios adicionales que sirven como enlace entre diferentes moléculas reguladoras, así son capaces de integrar vías de señalización independientes o movilizarse a diferentes entornos celulares (figura 3). La mayoría de proteínas RGS se unen preferentemente a las subunidades $G\alpha$ en estado de transición de hidrólisis de GTP, en el que la $G\alpha$ -GTPasa inicia la conversión de GTP a GDP (Berman y col., 1996; Hunt y col., 1996). La unión de las subunidades $G\alpha$ -GTP activadas por receptor con sus efectores genera este estado de transición, de manera que

las proteínas $G\alpha$ pueden alcanzar y regular a sus efectores antes de que las RGS promuevan su desactivación. En contraste, los miembros de la subfamilia RGS-RZ se unen con afinidad similar a proteínas $G\alpha$ en estado activado ($G\alpha$ -GTP) o en estado de transición (Wang y col., 1997). La capacidad de las RGS-RZ de unirse a las subunidades $G\alpha$ -GTP sugiere que estas proteínas reguladoras podrían reducir la activación de efectores mediada por las $G\alpha$, por lo que funcionarían como antagonistas de efectores, o que ellas mismas podrían desempeñar un papel efector (Hepler y col., 1997; Garzón y col., 2005a).




Figura 3. Estructura y clasificación de las proteínas RGS y tipo-RGS de mamíferos. Las proteínas están orientadas con su extremo amino a la izquierda y carboxilo a la derecha, y están clasificadas según el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio RGS. Dominios +++, hélice anfipática; RGS, *Regulator of G protein Signaling*; DEP, *Dishevelled*, EGL-10, *Pleckstrin*; R7H, *R7 Homology domain*; GGL, *G protein Gamma-Like domain*; PDZ, PSD-95/Dgl/ZO-1; PTB, *PhosphoTyrosine Binding domain*; RBD, *Ras Binding Domain*; CC, *Coiled Coil*; CRD, *Cysteine-Rich Domain*; PDZ-BD, *PDZ Binding Domain*; GSK3-BD, *GSK3 Binding Domain*; β -cat BD, *β -catenin Binding Domain*; PP2A, *Protein Phosphatase 2A homology*; DIX, *Dishevelled-AXin domain*; PKA-BD, *Protein Kinase A Binding Domain*; DH, *Dbl Homology domain*; PH, *Pleckstrin Homology domain*; PXA, *Phox Associated domain*; PX, *Phox homology domain*. Adaptado de (Hollinger y Hepler, 2002).

La señalización de los GPCRs también puede modularse a nivel de los dímeros $G\beta\gamma$ por la fosducina y las proteínas tipo fosducina (PhLP). La fosducina tiene una expresión muy restringida, siendo abundante en retina y glándula pineal (Reig y col., 1990), pero no en cerebro (Sunayashiki-Kusuzaki y col., 1997); la fosducina retinal se une a los dímeros $Gt\beta\gamma$, liberados tras la activación del receptor de rodopsina, bloqueando su acción sobre los efectores e impidiendo la reasociación del heterotrímero $Gta\beta\gamma$ (Lee y col., 1992; Yoshida y col., 1994; Gaudet y col., 1999). Las PhLP son proteínas de estructura y función análogas a la fosducina que se expresan abundantemente en casi todos los tejidos incluido el cerebro (Miles y col., 1993; Thibault y col., 1997; Garzón y col., 2002). Hasta la fecha, se han identificado dos isoformas de la PhLP: una larga (L) y una corta (S) que difieren en el tamaño de su extremo amino terminal, conteniendo 297 y 218 residuos respectivamente (Miles y col., 1993). La $PhLP_L$ es la única isoforma que contiene en su extremo N-terminal una secuencia de 11 aminoácidos que posibilita la interacción con el complejo $G\beta\gamma$ (Hawes y col., 1994; Xu y col., 1995). *In vitro*, la $PhLP_L$ se une con alta afinidad a los dímeros $G\beta\gamma$, bloqueando su acción sobre los efectores celulares (Schröder y Lohse, 1996; Schulz y col., 1996; Thibault y col., 1997; Humrich y col., 2005). En el sistema nervioso maduro, la $PhLP_L$ está presente como una isoforma no glicosilada de 38 KDa y como isoformas glicosiladas de 45, 100 y 150 KDa (Sánchez-Blázquez y col., 2008); se ha descrito que la isoforma no glicosilada citosólica de $PhLP_L$ interacciona con el complejo citosólico chaperonina mediando el correcto plegamiento y ensamblaje de los dímeros $G\beta\gamma$ de nueva síntesis por un proceso dependiente de caseína quinasa 2 (Lukov y col., 2005; Lukov y col., 2006). Las formas glicosiladas están ancladas

a la membrana donde se asocian con los dímeros $G\beta\gamma$ libres originados por la acción de agonistas sobre los GPCRs (Garzón y col., 2002; Sánchez-Blázquez y col., 2008).

La regulación de las subunidades $G\alpha$ GTP y los dímeros $G\beta\gamma$ va a determinar la potencia y duración de los efectos de los agonistas (Figura 4). En los últimos años, se ha comprobado que estas proteínas de señalización también están implicadas en la desensibilización del receptor. Esto se ha estudiado tanto para las RGS que actúan directamente sobre las subunidades $G\alpha$ activadas (Garzón y col., 2001; Sánchez-Blázquez y col., 2003; Garzón y col., 2003; Garzón y col., 2004) como para las proteínas tipo fosducina que regulan los dímeros $G\beta\gamma$ (Garzón y col., 2002) (figura 4).

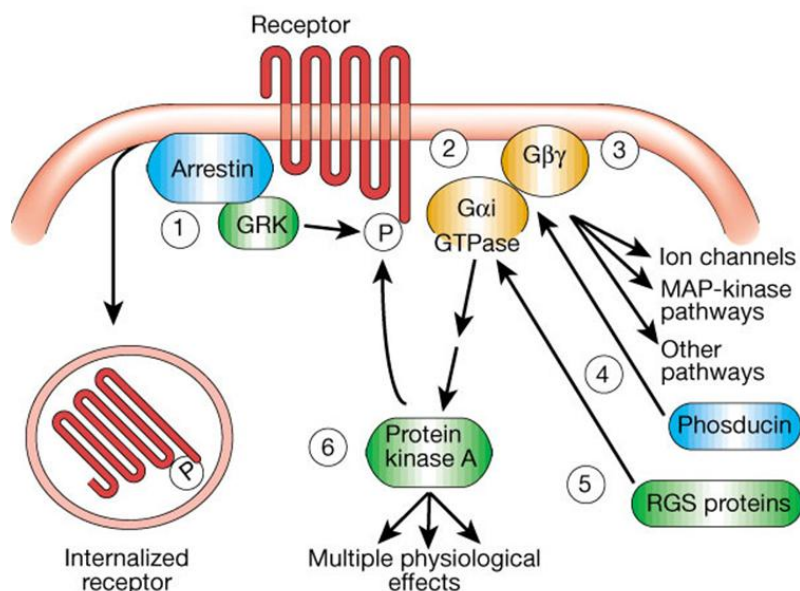


Figura 4. Representación esquemática de los principales mecanismos de desensibilización de GPCRs inducida por agonistas. La fosforilación de residuos intracelulares de receptor por GRKs, seguida de la unión de β -arrestinas e internalización, es el mecanismo clásico de desensibilización de GPCRs (1). Puede llevar al reciclaje y reinsertión del receptor en la membrana plasmática (recuperándose la respuesta al agonista) o a su degradación proteolítica en lisosomas. La sobre-regulación de PKA tras la administración crónica del agonista también puede fosforilar y regular la función del receptor acoplado al agonista o de otros receptores próximos a él (6). Otros posibles mecanismos incluyen alteraciones en la cantidad de proteínas $G\alpha$ (2) o de subunidades $\beta\gamma$ (3), o la regulación de éstas por otras proteínas como las proteínas tipo fosducina (4) o las RGS (5). *Adaptado de (Nestler y Landsman, 2001).*

No obstante, hasta mediados de los 80 la fosforilación de los receptores G por proteína quinasas dependientes de segundos mensajeros, como PKA o PKC, se consideró el mecanismo más importante de desensibilización de GPCRs (Benovic y col., 1985). Este tipo de desensibilización conlleva un mecanismo retrogrado de regulación en el que la

producción de segundos mensajeros, generados tras la estimulación del receptor por un agonista, activa quinasas (PKA es activada por AMPc y PKC por DAG) que fosforilan al receptor, disminuyendo su actividad y la producción de segundos mensajeros (figura 4). Posteriormente, el descubrimiento del papel de las quinasas de receptores G (GRKs) y de las β -arrestinas en la desensibilización de los GPCRs (Benovic y col., 1986; Lohse y col., 1990) relegó la importancia de las quinasas dependientes de segundo mensajero a un segundo plano y permitió el desarrollo de un modelo clásico de desensibilización de GPCRs, que se considera aplicable a la mayoría de estos receptores (figura 4). Según este modelo, las quinasas de la familia GRK fosforilan receptores activados por agonista, permitiendo la unión de las β -arrestinas, que desacoplan el receptor de las proteínas G e inician el proceso de endocitosis (Lefkowitz, 1998; Pitcher y col., 1998; Lefkowitz y Shenoy, 2005). En el interior celular, el receptor puede volver de nuevo a la superficie de la membrana celular o seguir una vía de proteólisis. La vuelta del receptor endocitado a la membrana facilita que se recupere la respuesta al agonista (Ferguson y col., 1998). La degradación proteolítica del receptor en los lisosomas reduce el número de receptores en superficie, disminuyendo su respuesta (Trejo y col., 1998).

2.1. RECEPTORES OPIOIDES

2.1.1. Sistema opioide endógeno



El opio o jugo extraído de la adormidera *Papaver somniferum* (figura 5) es uno de los agentes con actividad farmacológica más antiguo conocido por los humanos. En 1806, Sertürner consiguió aislar por primera vez una muestra cristalina del principal constituyente alcaloide del opio, al que denominó morfina (para señalar su poder sedante y al dios del sueño *Morpheus*). Una vez aislada la morfina, se descubrieron otros alcaloides presentes en el opio, como la codeína descubierta por Robiquet en 1832, o la papaverina aislada por Merck en 1848.

En 1850, la morfina comenzó a utilizarse en clínica, para procedimientos quirúrgicos menores, dolor crónico y postoperatorio y como adyuvante de anestésicos generales. Al comprobar que este compuesto tenía un potencial adictivo tan alto como el del opio, su uso fue restringido. En ese momento, se inició una búsqueda de drogas opioides no adictivas, más seguras y con mayor eficacia que a día de hoy todavía no ha dado sus frutos. Todos los compuestos sintéticos que se han introducido en clínica comparten las mismas desventajas que los opioides clásicos. Sin embargo, la búsqueda de nuevos agonistas opioides ha llevado a la síntesis de antagonistas y compuestos con propiedades mixtas como agonistas-antagonistas, que han ampliado las opciones terapéuticas y proporcionado herramientas para estudiar el mecanismo de acción de los opioides.

La farmacología desarrollada alrededor de los derivados morfínicos junto con la aplicación de técnicas de fijación de radioligandos confirmó la existencia de receptores específicos para estos compuestos. Este descubrimiento junto con la observación de que la estimulación eléctrica de ciertas regiones cerebrales producía analgesia sensible a antagonistas opioides, como la naloxona (Akil y col., 1972; Akil y col., 1976), fueron decisivos para impulsar una serie de estudios dirigidos a la identificación de los ligandos opioides endógenos. En 1975, Kosterlitz y Waterfield observaron que extractos cerebrales contenían un factor que inhibía la liberación de acetilcolina de nervios que inervaban el íleon de cobaya (Kosterlitz y Waterfield, 1975). Esta inhibición era bloqueada por naloxona. Los factores responsables de estos efectos resultaron ser dos pentapéptidos cuya secuencia únicamente difería en su aminoácido carboxilo terminal, metionina y leucina, por lo que se denominaron metionina-enkefalina y leucina-enkefalina respectivamente (Hughes y col., 1975). Poco después, se observó que la secuencia de la metionina-enkefalina estaba presente en el extremo N-terminal de otra molécula, la β -endorfina (Cox y col., 1976), un fragmento de β -lipotropina que había sido aislado años antes de extractos de pituitaria de camello (Li y Chung, 1976). Como las encefalinas, la β -endorfina presentaba una alta afinidad por los receptores opioides cerebrales. Así, tras la identificación y caracterización de las encefalinas, se han descubierto otros péptidos que se caracterizan por contener en su extremo amino

terminal la secuencia tirosina-glicina-glicina-fenilalanina-(metionina/leucina). Estos péptidos se clasifican en tres familias (encefalinas, endorfinas y dinorfinas) y derivan de tres precursores diferentes: pro-encefalina (Noda y col., 1982), pro-dinorfina (Kakidani y col., 1982) y pro-opiomelanocortina (Nakanishi y col., 1979). Las dos encefalinas, metionina- y leucina-encefalina, junto con otros péptidos más largos (Met-encefalina-Arg-Phe, Met-encefalina-Arg-Gly-Leu, Péptido E, Péptido F y amidorfina) derivan de la pro-encefalina; la pro-dinorfina da lugar a las dinorfinas A y B y a la α - y β -neoendorfina, y la pro-opiomelanocortina da origen a las β -endorfinas. Más recientemente se ha unido a la familia de péptidos opioides endógenos el grupo de las endomorfinas, que incluye la endomorfinas-1 y -2. Las endomorfinas son únicas con respecto a otros péptidos opioides ya que no derivan de los precursores anteriormente citados y tienen alta selectividad por el MOR (Zadina y col., 1997).

Aunque se ha intentado correlacionar cada familia de ligandos con un receptor opioide específico, la realidad es que estos péptidos presentan afinidades similares por más de un receptor opioide. La metionina-encefalina y leucina-encefalina son más afines al DOR, sin embargo, los péptidos de esta familia que contienen extremos C-terminales más largos presentan también afinidad por los receptores MOR y KOR; la dinorfina A, α - y β -neoendorfinas presentan una afinidad preferencial por el KOR, pero también pueden unirse a los receptores MOR y DOR; y la β -endorfina activa los receptores MOR y DOR pero también tiene baja actividad sobre el KOR (Garzón y col., 1983; Mansour y col., 1995b).

2.1.2. Descubrimiento de los receptores opioides: tipos y subtipos

La existencia de receptores para drogas opioides se propuso por primera vez en 1954 por Beckett y Casy, basándose en estudios de relación estructura-actividad de una serie de opiáceos sintéticos. Sin embargo, la demostración definitiva de su existencia no llegó hasta la década de los 70 mediante estudios de unión de radioligandos (Pert y Snyder, 1973; Simon y col., 1973; Terenius, 1973). Tras el descubrimiento de sitios de unión específicos para los opioides, se abrió paso la idea de la existencia de más de un tipo

de estos receptores en el sistema nervioso. La primera evidencia concluyente de que estos receptores no formaban una población homogénea la presentaron Martin y colaboradores en 1976 (Martin y col., 1976). Llevaron a cabo un análisis detallado de las propiedades neurofisiológicas y comportamentales de varios compuestos opiáceos y estudiaron la tolerancia cruzada entre ellos. Los resultados de estos experimentos permitieron proponer 3 tipos de receptores opioides, designados en función de las iniciales de los agonistas utilizados: Mu o MOR (por morfina), Kappa o KOR (por ketaciclazocina) y Sigma (por SKF10,047 o N-alilmetazocina). Al poco tiempo, el análisis farmacológico de los efectos de péptidos opioides en el íleon de cobaya y en el conducto deferente de ratón permitieron el descubrimiento de otro receptor opioide, llamado Delta o DOR (en alusión a deferente) (Lord y col., 1977). En la actualidad, se ha excluido al receptor Sigma de la familia de receptores opioides (Snyder y Pasternak, 2003). Posteriormente, la disponibilidad de diferentes ligandos agonistas y antagonistas permitió la identificación de subtipos para los tres receptores opioides. En este sentido, se han descrito 3 subpoblaciones para el MOR (MOR1, MOR2 y MOR3) (Pasternak, 1982; Gintzler y Pasternak, 1983; Pasternak y Wood, 1986; Stefano y col., 1993; Makman y col., 1995), 2 para el DOR (DOR1 y DOR2) (Jiang y col., 1991; Sofuoglu y col., 1991; Stewart y Hammond, 1993) y 3 para el KOR (KOR1, KOR2 y KOR3) (Morre y col., 1983; Castanas y col., 1984; Clark y col., 1989).

Los primeros intentos para caracterizar molecularmente los receptores opioides fueron infructuosos. La purificación a partir de tejido nervioso de la proteína o proteínas receptoras no fue posible dada la baja densidad de receptores opioides en este tejido. A finales de 1992, dos grupos lograron clonar casi simultáneamente el primer receptor opioide, el DOR; utilizaron librerías de ácido deoxirribonucleico complementario (ADNc) derivadas de la línea celular murina NG108-15, que expresa el DOR en mayor abundancia que el tejido nervioso (Kieffer y col., 1992; Evans y col., 1992). Una vez conocida la secuencia de ADNc del DOR de ratón, la gran homología existente entre los receptores opioides permitió la identificación en un corto período de tiempo del ADNc de MOR, DOR y KOR en varias especies animales y del humano (Chen y col., 1993; Wang y col., 1994; Knapp y col., 1994; Mansson y col., 1994; Xie y col., 1994) y de los tres genes diferentes que codifican para los tres tipos distintos de receptores opioides (Simonin y

col., 1994; Nishi y col., 1994; Min y col., 1994; Augustin y col., 1995; Liu y col., 1995; Yakovlev y col., 1995). En este momento, los estudios de clonación revelaron la secuencia de otro receptor similar a los opioides, el ORL1 o “*Opioid-Receptor-Like 1*”, pero diferente en sus características de unión a ligandos (Mollereau y col., 1994; Fukuda y col., 1994). La gran mayoría de agonistas opioides no se unen a los receptores ORL1 y tampoco lo hacen los antagonistas naloxona y naltrexona. Por esta razón, MOR, DOR y KOR se consideran los receptores opioides clásicos de la familia.

Un problema todavía sin resolver es que la farmacología de los receptores opioides predice la existencia de un número de receptores mayor a los identificados mediante estudios de biología molecular. Parte de estas discrepancias se han explicado por la existencia de variantes generadas por la lectura alternativa de los genes que codifican para los receptores opioides; en concreto, el subtipo MOR1, principal responsable de la analgesia opioide supraespinal, consta de 28 variantes de las cuales 15 difieren estructuralmente en el extremo C-terminal del receptor, una región importante para la transducción de la señal tras la activación del receptor (Pan y Pasternak, 2011).

2.1.3. Distribución y localización anatómica

El MOR está ampliamente distribuido en prosencéfalo, mesencéfalo y metencéfalo. Se encuentra en alta densidad en neocórtex, caudado-putamen, núcleo accumbens, tálamo, hipocampo, amígdala, colículo superior e inferior, núcleo del tracto solitario, núcleo trigémino espinal y asta dorsal (Mansour y col., 1988). Este receptor está presente en todos los componentes supraespinales conocidos del circuito de modulación del dolor: corteza insular, amígdala, hipotálamo, sustancia gris periacueductal (PAG), tegmento pontino dorsolateral, médula rostral rostromedial y asta dorsal (Mansour y col., 1988; Arvidsson y col., 1995; Mansour y col., 1995a; Akil y col., 1998), de acuerdo con el papel que entraña en la regulación de la nocicepción. En comparación con el MOR, el DOR tiene una distribución más restringida en el cerebro, que se corresponde con sus funciones de integración motora, olfato y funcionamiento cognitivo; mientras que el KOR

se encuentra en zonas importantes para la homeostasis, ingesta, percepción del dolor y funcionamiento neuroendocrino (Mansour y col., 1988).

Los receptores opioides se expresan también a nivel del sistema nervioso periférico modulando diversas funciones fisiológicas. De esta forma, se encuentran a nivel de fibras nerviosas sensoriales y simpáticas de la piel y de las articulaciones, en los plexos del intestino, en la vejiga urinaria y los conductos deferentes, en las células endocrinas y en el sistema inmune (Stein, 1993; Puig y Montes, 1998).

2.1.4. Efectos farmacológicos de la activación de receptores opioides: analgesia

La activación de receptores opioides produce numerosos efectos biológicos como disminución de la motilidad intestinal, miosis, bradicardia, euforia, sedación, hipotermia, depresión respiratoria, etc. Sin embargo, una de las funciones más importantes del sistema opioide, desde el punto de vista terapéutico, es el control del dolor. Agonistas exógenos de los receptores MOR, DOR y KOR producen analgesia e, incluso, se ha propuesto la existencia de un tono opioide endógeno que regula la información nociceptiva. Debido a la amplia distribución del sistema opioide en el organismo, este sistema controla la nocicepción tanto a nivel periférico como central. En el SNC actúa sobre el sistema aferente, integrando estímulos dolorosos que llegan de la periferia, y sobre el sistema eferente, que regula la transmisión de la sensación nociceptiva a la médula espinal.

De acuerdo con su origen, el dolor puede dividirse en: dolor nociceptivo o inflamatorio, que aparece cuando un estímulo potencialmente dañino estimula los receptores nociceptivos periféricos somáticos o viscerales (superficiales o profundos), en el que se incluye el dolor originado en cualquier parte del cuerpo que no pertenezca al SNC; y dolor neuropático, ocasionado por una lesión directa sobre el sistema nervioso. Los fármacos opioides son útiles principalmente en el tratamiento del dolor nociceptivo de alta intensidad, tanto agudo como crónico. Del conjunto de fármacos opiáceos, la morfina, que activa el MOR, es el fármaco prototipo y el más utilizado en la clínica del dolor, con este interés nuestra investigación se ha centrado fundamentalmente en este receptor.

El tipo de estímulo nociceptivo parece poder regular el tipo de receptor opioide implicado en la respuesta analgésica. Estudios llevados a cabo con ratones *Knock-Out* (KO) de MOR revelan un aumento de la sensibilidad al calor que no se aprecia en ratones deficientes de DOR y KOR (Kieffer y Gaveriaux-Ruff, 2002). En experimentos electrofisiológicos llevados a cabo en ratas espinalizadas, agonistas de los receptores MOR y KOR reducen los reflejos producidos por estímulos dolorosos térmicos y mecánicos con igual intensidad y de forma dosis dependiente (Parsons y Headley, 1989); pero en la nocicepción visceral inducida por distensión colorectal, sólo los agonistas opioides μ demostraron tener un papel significativo (Harada y col., 1995).

La activación persistente de los receptores de NMDA es responsable de los cambios neurales que acompañan diferentes variantes del dolor neuropático, como la neuropatía diabética, la neuralgia post-herpética, el dolor inflamatorio crónico o la neuropatía en pacientes con cáncer. En estas circunstancias, la administración de opioides como la morfina proporciona un alivio limitado del dolor (Chapman y col., 1994; Sigtermans y col., 2009). Por tanto, para tratar el dolor neuropático en clínica se tiene que aumentar sustancialmente las dosis de opioides administradas con respecto a aquellas que son eficaces en el tratamiento del dolor nociceptivo, e incluso así su eficacia es tan solo parcial. Este hecho se puede explicar en base a estudios moleculares y farmacológicos que indican que la respuesta analgésica a la morfina se encuentra bajo la regulación funcional negativa de la cascada NMDAR/óxido nítrico sintasa neural (nNOS) (Inoue y col., 2003; Rodríguez-Muñoz y col., 2008). En este sentido, la inhibición de la nNOS aumenta los efectos antinociceptivos de varios agonistas opioides, incluida la morfina (Machelska y col., 1997). También se ha demostrado que la administración de antagonistas del NMDAR mejora o prolonga la analgesia opioide en humanos y remite la alodinia táctil y la hiperalgesia características del dolor neuropático (Mizoguchi y col., 2009), sin embargo, estas drogas producen una serie de efectos adversos que incluyen somnolencia, alucinaciones o coma, que hacen inabordable su uso en clínica (Palmer, 2001). Por este motivo, los opioides se combinan normalmente con antidepresivos, anticonvulsivantes, y bloqueantes de canales de sodio, que aumentan su eficacia (Mizoguchi y col., 2009).

2.1.5. Señalización opioide

En general, la activación de los receptores opioides conduce a la inhibición de la adenilato ciclasa, a la estimulación de canales de K^+ y a la modulación de canales de Ca^{2+} . Los agonistas opioides muestran diferente afinidad por el MOR en función de si este está acoplado a una *Gai*, *Gao* o *Gaz* (Garzón y col., 1998; Stanasila y col., 2000; Massotte y col., 2002) y este acoplamiento va a determinar el patrón de activación de las proteínas G (Sánchez-Blázquez y col., 2001). La señalización supraespinal del MOR está estrechamente ligada a la *Gaz*.

Además de estas acciones fundamentales, la activación de receptores opioides en determinadas circunstancias puede producir elevación del AMPc por estimulación de la adenilato ciclasa (Chan y col., 1995) y movilización intracelular de iones calcio a partir de depósitos intracelulares. En este último caso, la estimulación del receptor por un agonista provoca la activación de la fosfolipasa C (PLC), induciendo la formación de mensajeros intracelulares (IP3 y DAG). El IP3 provoca la liberación de calcio de depósitos intracelulares con canales sensibles a IP3 (Smart y Lambert, 1996; Smart y col., 1997; Law y col., 2000). Esta movilización de calcio afecta a respuestas intracelulares mediadas por proteínas sensibles a calcio. También se han incluido entre las acciones de los opioides la activación de la PKC (Williams y col., 2001), la activación de la cascada de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Yoburn y col., 2003), el control de la proteína quinasa B (PKB/AKT) (New y col., 2007), la regulación de activadores específicos de la función GTPasa de los Rap1 (Meng y col., 1999; Mochizuki y col., 1999; Jordan y col., 1999) y la modulación de la tirosina quinasa Src (Ma y col., 2000).

2.1.6. Mecanismos de regulación de la señalización de receptores opioides: desensibilización y tolerancia

Aunque los opioides están entre los analgésicos más efectivos conocidos, su uso está muy controlado debido a su naturaleza adictiva y, sobre todo, al riesgo de producir tolerancia fuera del control médico adecuado. La administración repetida de estas drogas

lleva a una disminución progresiva de su potencia, lo que conlleva la necesidad de utilizar dosis más altas para conseguir el mismo efecto, con el riesgo de exacerbar efectos adversos como depresión respiratoria y cambios cognitivos y de que aumenten las probabilidades de desarrollar dependencia. En modelos animales, la tolerancia a los efectos antinociceptivos de los opioides se ha observado incluso tras la administración de una sola dosis (Kornetsky y Bain, 1968; Huidobro y col., 1976), y su administración a largo plazo no sólo lleva a una profunda tolerancia sino también a la dependencia física de estas sustancias. Hoy en día se ha avanzado lo suficiente para entender los mecanismos moleculares por los que se produce la tolerancia a opiáceos y retrasar su aparición cuando se están utilizando en clínica.

En sistemas celulares, los receptores opioides activados por agonistas se internalizan en vesículas recubiertas de clatrina por un proceso que implica su fosforilación por GRKs y posterior asociación con las proteínas citoplasmáticas β -arrestinas (Arden y col., 1995; Trapaidze y col., 1996; Li y col., 1999). En el interior celular, los receptores pueden volver de nuevo a la superficie de la membrana celular o seguir una vía de proteólisis. Aunque los MORs endocitados pueden ser degradados en lisosomas, la mayoría se reciclan rápidamente a la membrana plasmática por mecanismos dependientes de señales reguladoras (Tanowitz y von Zastrow, 2003). Resulta de interés comentar que la eficacia de los agonistas opioides para estimular la endocitosis del MOR difiere, y esto está relacionado con su capacidad para promover la fosforilación del receptor en residuos citosólicos dependiente de GRKs (Zhang y col., 1998; Koch y col., 2001). La morfina induce un alto grado de desensibilización antinociceptiva al producir poca fosforilación e internalización de los MORs (Finn y Whistler, 2001; Rodríguez-Muñoz y col., 2007c). Por el contrario, otros agonistas opioides, como DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵]-encefalina), promueven eficientemente la endocitosis del MOR dando lugar a una leve tolerancia analgésica (Koch y col., 2005).

En aquellos casos en los que los agonistas no son capaces de desencadenar la fosforilación efectiva del receptor y, por tanto, su internalización-reciclaje-resensibilización, otros mecanismos de regulación diferentes a la internalización se ponen

en marcha para controlar la actividad de MOR. En uno de estos mecanismos juegan un papel esencial las proteínas de señalización celular reguladas por el receptor. Estudios de nuestro grupo describen que la tolerancia a morfina administrada por vía intracerebroventricular (icv) se induce por la transferencia estable de las subunidades $G\alpha$ activadas por MOR a proteínas RGS de las subfamilias R7 y RZ (Garzón y col., 2005b; Rodríguez-Muñoz y col., 2007a), de manera que aumenta el número de dímeros $G\beta\gamma$ libres en las proximidades del receptor.

Otro modulador importante de la función del MOR es la isoforma larga de las proteínas tipo fosducina. Tras la activación del MOR, la proteína quinasa II dependiente de calcio-calmodulina (CaMKII) se transloca al entorno del receptor opioide, donde fosforila a las proteínas PhLP_L. Esta fosforilación aumenta la asociación de las isoformas glicosiladas de la PhLP_L con los dímeros $G\beta\gamma$ libres y con las proteínas 14-3-3. La unión a proteínas 14-3-3 estabiliza el complejo PhLP_L- $G\beta\gamma$, evitando la reasociación del heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ bajo el control del MOR (Garzón y col., 2002; Sánchez-Blázquez y col., 2008). Así, el secuestro de las proteínas $G\beta\gamma$ aumenta la pérdida de subunidades $G\alpha$ activadas en las proximidades de MOR (Garzón y col., 2005b), que se asocian a proteínas RGS (Garzón y col., 2005b; Garzón y col., 2005c; Rodríguez-Muñoz y col., 2007a; Rodríguez-Muñoz y col., 2007c). La interacción persistente entre proteínas RGS y $G\alpha$ parece estar facilitada por modificaciones post-transduccionales de las RGS que evitan su función GAP. Entre ellas, la fosforilación de residuos de serina en el dominio RGS de proteínas RGS-R7 y su seguida asociación a proteínas 14-3-3 (Garzón y col., 2005b), y la sumoilación de determinadas secuencias del dominio RGS de las RGS-RZ pueden resultar relevantes (Rodríguez-Muñoz y col., 2007a).

Por otro lado, el DOR también podría estar implicado en las respuestas agudas y crónicas a morfina. Estudios farmacológicos han demostrado que MOR y DOR interaccionan, influenciándose mutuamente en su comportamiento (Traynor y Elliott, 1993). La reducción selectiva del número de DORs y la administración de antagonistas de este receptor disminuyen el desarrollo de tolerancia a morfina y su dependencia (Abdelhamid y col., 1991; Fundytus y col., 1995; Sánchez-Blázquez y col., 1997; Zhu y

col., 1999). La utilización de tratamientos mixtos con agonistas del MOR y antagonistas del DOR reducen igualmente la tolerancia analgésica a morfina (Schiller y col., 1999; Wells y col., 2001).

A nivel de efectores, se sabe que la activación persistente de los receptores opioides induce una regulación a la alta de algunas isoformas de la adenilato ciclasa, en particular la α_2 , al tiempo que se produce una disminución de la actividad de las fosfodiesterasas encargadas de degradar el AMPc (Law y col., 2000); se desensibilizan los canales de K^+ y disminuyen las corrientes de este ión sensibles a voltaje (Kovoor y col., 1995); aumenta la expresión de canales de Ca^{2+} tipo L en animales tolerantes (Ohnishi y col., 1990; Welch y Olson, 1991; Smith y col., 1999a); y aumenta la participación de la vía IP3/DAG (Smith y col., 1999b), que es limitada tras una exposición aguda de opioide (Waldhoer y col., 2004).

2.2. RECEPTORES CANNABINOIDES

2.2.1. Sistema cannabinoide endógeno

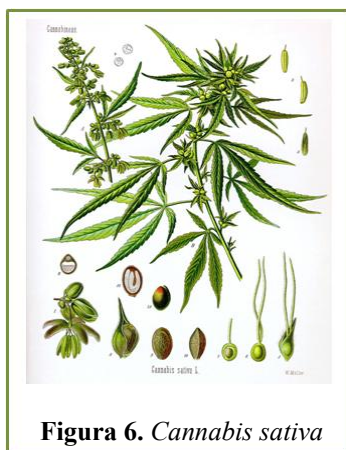


Figura 6. *Cannabis sativa*

Las preparaciones obtenidas a partir de la planta de *Cannabis sativa* (figura 6) se han utilizado a lo largo de la historia con fines industriales, medicinales y recreativos. Sin embargo, la investigación sobre sus principios activos es relativamente reciente. En los años 60, Gaoni y Mechoulam aislaron su principal componente psicoactivo, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) (Gaoni y Mechoulam, 1964).

Inicialmente, debido a la naturaleza lipofílica de la molécula, se pensó que el THC ejercía su acción a través de interacciones inespecíficas con las membranas celulares que darían lugar a modificaciones en el equilibrio lípido-proteína y que podrían afectar a la funcionalidad de diversas proteínas de membrana (Lawrence y Hill, 1975). Sin embargo,

estudios detallados de relación estructura-actividad sugirieron un mecanismo mediado por receptor como el responsable de su actividad psicoactiva.

El descubrimiento de los receptores para cannabinoides llevó a los investigadores a emprender la búsqueda de ligandos endógenos que actuaran sobre los mismos. Estos ligandos se conocen como endocannabinoides y, desde un punto de vista estructural, son moléculas derivadas de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Entre los endocannabinoides identificados hasta ahora se encuentran: la anandamida (N-araquidonil-etanolamida), el 2-araquidonilglicerol, el éter del 2-araquidonil-glicerol (éter de noladín), el O-araquidoniletanolamina (virodhamina), y la N-araquidonil-dopamina. En la actualidad, se considera a la anandamida y al 2-araquidonilglicerol (Devane y col., 1992; Mechoulam y col., 1995) como los dos endocannabinoides más importantes. Ambos se unen tanto a receptores cannabinoide tipo 1 (CB1R) como tipo 2 (CB2R), aunque la anandamida exhibe mayor afinidad por el CB1R.

La elucidación de los elementos que constituyen el sistema cannabinoide endógeno ha permitido demostrar la existencia de un nuevo sistema de neurotransmisión o neuromodulación en el cerebro. En la actualidad, se dispone de numerosos agentes farmacológicos (agonistas, antagonistas, inhibidores del proceso de finalización de la señal biológica...) que nos permiten interferir sobre el sistema endocannabinoide, constituyendo una herramienta fundamental para el estudio de la funcionalidad de este sistema de señalización.

2.2.2. Receptores cannabinoides

El descubrimiento del THC estimuló la generación de una gran cantidad de análogos sintéticos en la década de 1970. El estudio de los efectos biológicos del THC y sus análogos reveló que poseían selectividad estructural (Hollister, 1974) así como estereoselectividad (Jones y col., 1974), lo que señalaba una interacción droga-receptor. Sin embargo, no hubo evidencias definitivas de la existencia de receptores cannabinoides hasta que, en noviembre de 1988, el grupo de Allyn Howlett demostró la existencia de sitios de unión estereoespecíficos para el agonista cannabinoide sintético CP55.940 en

membranas sinaptosomales de cerebro de rata (Devane y col., 1988). La disponibilidad de radioligandos también permitió el mapeo de los receptores cannabinoides en cerebro mediante autoradiografía (Herkenham y col., 1991), identificándose un receptor acoplado a proteína G huérfano como receptor cerebral de cannabinoides, que sería conocido más tarde como receptor CB1.

El CB1R fue clonado por vez primera en 1990 a partir de una biblioteca de ADNc de corteza cerebral de rata (Matsuda y col., 1990), y en 1991 se identificó en el ser humano en tronco cerebral y en tejido reproductor (Gerard y col., 1991), aunque los transcritos detectados a nivel cerebral eran mucho más abundantes que los encontrados en tejido reproductor. Se han identificado dos variantes del receptor CB1: CB1A, que posee un extremo amino terminal 61 aminoácidos más corto que el CB1, con los primeros 28 aminoácidos diferentes, conteniendo más residuos hidrofóbicos (Shire y col., 1995) y CB1B que presenta una delección de 33 aminoácidos en el extremo amino terminal con respecto a CB1. Parece que estas modificaciones son importantes para la regulación de la especificidad por el ligando y la expresión del receptor a nivel de superficie (las isoformas truncadas se expresarían más eficientemente que el receptor completo) (Ryberg y col., 2005). En 1993 se caracterizó un nuevo receptor para cannabinoides a partir de células mieloides de bazo de rata (Munro y col., 1993), se denominó CB2. Recientemente, también se ha detectado en cerebro (Van Sickle y col., 2005; Gong y col., 2006; Onaivi y col., 2006), en páncreas endocrino (Juan-Picó y col., 2006) y en hueso (Karsak y col., 2004).

Además de los receptores CB1 y CB2, se han ido acumulando a lo largo de los años evidencias farmacológicas que apoyan la existencia de uno o más receptores cannabinoides. El primer indicador de la existencia de receptores no CB1-CB2 vino del estudio de la acción vasodilatadora mesentérica de los cannabinoides (Wagner y col., 1999). Estudios con ratones deficientes en CB1 y CB2 apoyan también la existencia de nuevos receptores cannabinoides en sistema inmune (Rao y Kaminski, 2006). Además, se ha postulado la existencia de receptores cannabinoides diferentes a CB1 y CB2 en el SNC. En ratones sin CB1, se observó la inhibición de la transmisión excitatoria glutamatérgica

con WIN55.212-2 (Hajos y col., 2001). Breivogel y colaboradores mostraron la estimulación de la unión de $[S^{35}]$ -GTP γ S en rodajas de cerebro y en membranas preparadas a partir de cerebro de ratones KO de CB1 con WIN55.212-2 y anandamida (Breivogel y col., 2001). Entre los receptores propuestos como posibles nuevos receptores cannabinoides está el “*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*” o TRPV1, cuya participación en la vasorelajación ocasionada por algunos agonistas cannabinoides, como el WIN55.212-2, está ampliamente documentada (Zygmunt y col., 1999; Dannert y col., 2007). Además, dos receptores acoplados a proteína G huérfanos se han propuesto recientemente como nuevos receptores cannabinoides, el GPR119 (como diana para la oleoiletanolamida) (Overton y col., 2006) y GPR55, como diana de múltiples ligandos cannabinoides (Baker y col., 2006; Rao y col., 2006; Ryberg y col., 2007).

2.2.3. Distribución y localización anatómica

Mientras que los CB2R se encuentran localizados en su mayor parte a nivel periférico, el receptor CB1 es uno de los GPCRs más abundantes en cerebro (Howlett, 1998); aunque también se ha descrito su presencia a nivel periférico, localizándose en el pulmón, células del endotelio vascular, células del músculo liso, testículos, útero, bazo, glándula adrenal, amígdalas, corazón, conducto deferente y en la vejiga urinaria (Pertwee, 1997).

Estudios autoradiográficos en cerebro de rata han mostrado una distribución heterogénea de este receptor, con niveles elevados de unión específica en los ganglios basales (caudado-putamen lateral, globo pálido, núcleo entopeduncular y sustancia *nigra pars reticulata*), capa molecular del cerebelo e hipocampo, particularmente en el giro dentado (Herkenham y col., 1991); densidad moderada de unión en el lóbulo frontal y escasa en el tronco del encéfalo y médula espinal (Herkenham y col., 1991). Estudios que utilizan aproximaciones inmunohistoquímicas con anticuerpos frente al extremo carboxilo (Egertova y Elphick, 2000) o amino (Pettit y col., 1998; Tsou y col., 1998) del receptor CB1 y frente a la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Egertova y col., 1998), enzima que cataliza la hidrólisis de anandamida y que también puede degradar 2-araquidonilglicerol, corroboran los estudios autoradiográficos anteriores.

Existen muchas evidencias electrofisiológicas y de microscopía electrónica que sugieren una localización preferentemente presináptica de los receptores CB1, donde su activación causa inhibición de la liberación de distintos neurotransmisores (Schlicker y Kathmann, 2001) como el ácido γ - amino butírico (GABA) (Katona y col., 1999; Hajos y col., 2000) o glutamato (Gerdeman y Lovinger, 2001). Sin embargo, también se ha visto una localización postsináptica tanto del CB1R como del CB2R (Hohmann y col., 1999; Brusco y col., 2008; Scavone y col., 2010) lo que les acerca a una posible regulación de los receptores glutamatérgicos de NMDA y AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico). A este respecto, se ha descrito la colocalización de los receptores NMDA y CB1 en neuronas de la región CA3 del hipocampo de rata (Marchalant y col., 2008).

Asimismo, el CB1R no sólo se ha detectado en neuronas, también se ha visto en otras células nerviosas como astrocitos (Salio y col., 2002), oligodendrocitos (Molina-Holgado y col., 2002) y microglía (Cabral y col., 2001).

2.2.4. Efectos farmacológicos de la activación de receptores cannabinoides: analgesia

La idea actual es que una de las principales funciones fisiológicas del sistema endocannabinoide es el control de la nocicepción. Innumerables estudios demuestran que los cannabinoides, tanto naturales como sintéticos, son capaces de producir efectos antinociceptivos en diferentes modelos animales de dolor (Walker y Huang, 2002b). Así, los cannabinoides son efectivos en modelos de dolor agudo y en dolores crónicos de naturaleza neuropática e inflamatoria (Lichtman y Martin, 1991; Martin y col., 1999; Guindon y Beaulieu, 2006). La mayoría de los trabajos coinciden en afirmar que la acción analgésica de los cannabinoides se ejerce principalmente a través de los receptores CB1, y es debida a la capacidad que muestran para inhibir o bloquear la transmisión del impulso nociceptivo (Lichtman y Martin, 1997; Hohmann, 2002).

La actividad supresora del dolor de los cannabinoides está mediada por mecanismos supraespinales, espinales y periféricos (Hohmann, 2002; Iversen y Chapman,

2002; Rice y col., 2002; Walker y Huang, 2002a). A nivel supraespinal, el PAG juega un papel fundamental en analgesia. La estimulación del PAG ventral produce una analgesia mediada por la liberación de opioides endógenos que se bloquea por naloxona, mientras que la estimulación de la zona dorsal-lateral produce una analgesia no dependiente de opioides e insensible a naloxona (Cannon y col., 1982). Numerosos datos apoyan el papel del sistema cannabinoide en los circuitos que producen analgesia en el PAG dorsal y lateral (Lichtman y col., 1996; Walker y col., 1999); y el hecho de que los efectos analgésicos producidos por microinyecciones intra-PAG de WIN55.212-2 y HU210 se reviertan completamente con SR141716A destacan el papel de CB1R en esta analgesia (Palazzo y col., 2001; Finn y col., 2003). Estos hallazgos sugieren que tanto cannabinoides como opioides producen analgesia dentro del PAG mediante mecanismos distintos pero que se solapan parcialmente, lo que explicaría la interacción de ambos tipos de drogas en sus efectos analgésicos, como se demuestra con la capacidad de los antagonistas cannabinoides y opioides de revertir la analgesia opioide/cannabinoide (Cichewicz y col., 1999) y la sinergia del efecto antinociceptivo observada tras la co-administración de agonistas cannabinoides y opioides (Cichewicz y McCarthy, 2003).

2.2.5. Señalización cannabinoide

Se ha descrito que la transducción de señales a través de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 ocurre fundamentalmente a través de proteínas G del subtipo Gi/o, lo que produce la inhibición de la enzima adenilato ciclasa y un descenso de los niveles de AMPc intracelular (Pertwee, 1997). Existen evidencias convincentes de que el CB1R se acopla y regula tanto a proteínas Gi/o, sensibles a toxina pertússica (PTX), como a proteínas Gq/11 y Gz, insensibles a PTX. El endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol protege a las neuronas limitando la expresión de la ciclooxigenasa-2, un efecto mediado por las proteínas Gi/o (Zhang y Chen, 2008). El WIN55.212-2 reduce la liberación de acetilcolina en el hipocampo a través de un mecanismo regulado por Gi/o (Tzavara y col., 2003); asimismo, en cultivos de neuronas hipocampales, se ha observado que este agonista cannabinoide es capaz de promover un aumento de Ca^{2+} intracelular mediante la activación de la Gq/11, efecto que no se ha observado para otros cannabinoides como THC o metanandamida (Lauckner y col., 2005). Por otra parte, la analgesia supraespinal

producida por agonistas cannabinoides también está mediada por proteínas G sensibles e insensibles a PTX, siendo el efecto de WIN55.212-2 y metanandamida más resistente a PTX que el producido por agonistas como THC o ACEA (Garzón y col., 2009). Por tanto, la unión de diferentes agonistas al CB1R determina la clase de proteínas G que son activadas, lo que también se ha visto en el sistema opioide para el MOR y el DOR (Garzón y col., 1997; Garzón y col., 1998; Sánchez-Blázquez y col., 2001; Garzón y col., 2009).

La activación de los receptores CB1 disminuye la conductancia de canales de Ca^{2+} (Caulfield y Brown, 1992; Mackie y col., 1993; Shen y col., 1996) y aumenta la conductancia del K^+ (Mackie y col., 1995). Estos efectos se relacionan con la inhibición que producen los cannabinoides sobre la liberación de diferentes neurotransmisores (Schlicker y col., 2001). Estudios realizados en células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) transfectadas sugieren que el receptor CB2 no tiene efecto a nivel de las corrientes de Ca^{2+} ni de K^+ (Felder y col., 1995). La activación de los receptores cannabinoides también provoca la estimulación de la vía de las MAPK, involucrada en fenómenos proliferativos y de diferenciación (Bouaboula y col., 1995b; Bouaboula y col., 1996), y puede regular la actividad de la PLC, que hidroliza el fosfatidilinositol produciendo DAG e IP3; el aumento de IP3 ocasiona a su vez un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Netzeband y col., 1999; Zoratti y col., 2003).

2.2.6. Mecanismos de regulación de la señalización de receptores cannabinoides: desensibilización y tolerancia

La desensibilización de los GPCRs se asocia generalmente con la fosforilación del receptor por GRKs y posterior unión de β -arrestinas, lo que desencadena no sólo el desacoplamiento del receptor de sus proteínas G sino también su internalización mediada por vesículas recubiertas de clatrina (Krupnick y Benovic, 1998). Los cannabinoides inducen la desensibilización de sus receptores mediante este mecanismo, en el que son necesarios los residuos 460-464 del extremo carboxílico del CB1R (Hsieh y col., 1999). En oocitos de *Xenopus*, Jin y colaboradores demostraron que la desensibilización del CB1R dependiente de agonista está mediada por GRKs y β -arrestinas (Jin y col., 1999).

La exposición crónica a THC en animales activa significativamente determinados tipos de GRKs y β -arrestinas en diferentes áreas cerebrales, lo que indica su implicación en los cambios adaptativos del CB1R a largo plazo que conducen a la pérdida de estos receptores en la membrana (Rubino y col., 2006).

La eficiencia de los agonistas cannabinoides para estimular la endocitosis del receptor difiere, al igual que se ha observado para el MOR. Este hecho parece estar relacionado con la eficacia del agonista para activar al receptor. Agonistas cannabinoides con una eficacia alta de activación del receptor (WIN55.212-2, CP55.940 y HU210) causan una rápida internalización, mientras que metanandamida y THC muestran una baja capacidad endocítica que se corresponde con su baja eficacia intrínseca (Hsieh y col., 1999). Una exposición a corto plazo del agonista, promueve el reciclaje de los receptores internalizados a la membrana plasmática, por el contrario, tras una exposición prolongada, una importante fracción de los receptores internalizados se transporta a los compartimentos lisosomales para su degradación (Hsieh y col., 1999; Tappe-Theodor y col., 2007). De hecho, la interacción entre el extremo citosólico del CB1Rs y la proteína GASP1 (*G protein coupled receptor-Associated Sorting Protein 1*) juega un papel importante en este proceso (Tappe-Theodor y col., 2007; Martini y col., 2007). En este sentido, se ha descrito que la administración repetida de THC, CP55.940 o WIN55.212-2 disminuye la unión de radioligandos a los CB1Rs en secciones de cerebro u homogenados de membranas de cerebro total (Oviedo y col., 1993; Romero y col., 1997; Breivogel y col., 1999; Rubino y col., 2000b; Sim-Selley y Martin, 2002). La pérdida de CB1Rs tras el tratamiento prolongado con WIN55.212-2 o THC tiene lugar en todas las regiones cerebrales que contienen estos receptores (Sim-Selley y col., 2002), con variaciones en la magnitud de los cambios en función de la región analizada; es más intensa y rápida en hipocampo y cerebelo con respecto a otras áreas cerebrales, como los ganglios basales en los que la disminución de receptores es mucho menor (Romero y col., 1997; Breivogel y col., 1999), lo que sugiere la existencia de diferentes mecanismos de regulación del receptor a nivel cerebral.

También se han realizado estudios de unión de [35 S]GTP γ S tras la estimulación repetida del receptor cannabinoide por diferentes agonistas, que han revelado un alto grado de desensibilización de receptores CB1 en áreas cerebrales distintas, con variaciones en función de las regiones estudiadas (Sim y col., 1996; Breivogel y col., 1999; Rubino y col., 2000a; Rubino y col., 2000b; Sim-Selley y col., 2002). Aunque se ha observado una disminución de los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifican para diferentes proteínas G al administrar cannabinoides de forma subcrónica, no se han observado cambios en la cantidad total de estas proteínas (Rubino y col., 1997). Como resultado, no se conoce con exactitud si la pérdida de actividad G del CB1R se debe a la disminución del número de receptores en membrana, al desacoplamiento entre el receptor y sus proteínas G, a alteraciones en la expresión de las proteínas G o a una combinación de estos.

Otras quinasas diferentes a las GRKs se han implicado en la desensibilización del CB1R. La activación de PKC por Forbol 12-miristato 14-acetato bloquea la activación de canales GIRK y la inhibición de canales de Ca $^{2+}$ de tipo P/Q mediada por el CB1R. Este efecto de la PKC podría ser consecuencia de la fosforilación del residuo de Ser317 del tercer bucle intracelular del receptor (García y col., 1998). También se ha observado que KT5720, un inhibidor de PKA, y la proteína fosfatasa 1 (PP1), inhibidor de la familia Src de tirosina quinasas, revierten la tolerancia debida a la administración crónica de THC. En este estudio, la inhibición de PKC no revirtió la tolerancia antinociceptiva cannabinoide pero si se observó una disminución del efecto analgésico de THC en ratones no tolerantes, por lo que sugirieron que esta quinasa podría ser parcialmente responsable de la antinocicepción cannabinoide (Lee y col., 2003). En relación con la importancia de PKA en el desarrollo de tolerancia a THC, se ha descrito que la administración repetida del cannabinoide eleva los niveles de AMPc, aumentando consecuentemente la actividad de esta enzima (Rubino y col., 2000b); efecto que se incrementa tras la administración de antagonistas del CB1R (Hutcheson y col., 1998; Tzavara y col., 2000). Tras un tratamiento crónico con THC también se ha observado una modulación de la cascada de ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) en determinadas regiones cerebrales, que

proponen como un factor crítico en los fenómenos adaptativos a largo plazo tras la exposición prolongada a esta droga (Rubino y col., 2004; Rubino y col., 2006).

3. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NMDA

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central de mamíferos. Activa tanto receptores ionotrópicos como metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos de glutamato se dividen en tres familias, de acuerdo con su comportamiento farmacológico: N-metil-D-aspartato (NMDAR), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) y kainato. Los receptores ionotrópicos de glutamato son receptores tetraméricos (Laube y col., 1998) o pentaméricos y las subunidades que los integran son específicas para cada una de las tres familias (Dingledine y Conn, 2000). Están acoplados a canales iónicos y son permeables a cationes, aunque su permeabilidad a iones Na^+ y Ca^{2+} varía en función de la familia y de las subunidades que componen al receptor (Meldrum, 2000).

Numerosas evidencias apoyan la implicación del glutamato en la etiología de varias categorías de dolor persistente, incluyendo el dolor neuropático, el inflamatorio y el articular (Bleakman y col., 2006). El aumento a largo plazo de la eficacia sináptica de la transmisión glutamatérgica en las vías nociceptivas parece ser una de las causas de estas formas de dolor persistente. Dicho fenómeno, conocido como sensibilización central, se ha relacionado con el receptor de NMDA (Petrenko y col., 2003). La desregulación del sistema glutamatérgico también contribuye a la patofisiología de otros muchos desórdenes neurológicos como Parkinson, esquizofrenia, accidentes cerebro-vasculares e isquemia (Kotecha y MacDonald, 2003). Así, en accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas, la muerte neuronal secundaria producida se debe, en gran medida, a procesos de excitotoxicidad. La excitotoxicidad es consecuencia de una excesiva liberación de glutamato de las terminales presinápticas y de astrocitos, con la consiguiente sobreestimulación de los receptores de glutamato, especialmente del NMDAR (Gagliardi, 2000). Se sabe que la estimulación de los receptores de NMDA es la principal responsable del incremento de Ca^{2+} intracelular y de la puesta en marcha de la cascada isquémica

dependiente de calcio que conduce a la muerte celular y a los procesos que llevan al daño celular irreversible (Castillo, 2000). Estudios recientes relacionan la activación de los CB1R con la disminución del efecto excitotóxico producido por la excesiva estimulación de los NMDARs (van der Stelt y Di Marzo, 2005; Chen y col., 2005; Kim y col., 2006b; Liu y col., 2009).

3.1. Receptores de NMDA

Los NMDARs son complejos heteroméricos formados por diferentes combinaciones de tres tipos de subunidades: NR1, NR2 y NR3. Hay ocho subunidades NR1 diferentes generadas a partir de un solo gen, cuatro subunidades NR2 (A, B, C y D) y dos NR3 (A y B); las subunidades NR2 y NR3 se codifican por seis genes distintos (Dingledine y col., 1999). La estequiometría de los receptores de NMDA todavía no está bien establecida, pero el consenso es que los NMDARs son tetrámeros que en la mayoría de ocasiones incorporan dos subunidades NR1 y dos NR2 del mismo o diferente subtipo (Dingledine y col., 1999). Si bien, las subunidades NR1 también pueden combinarse con dos subunidades NR2 diferentes para formar receptores compuestos por complejos triheteroméricos, que se han encontrado en diferentes áreas cerebrales y en subpoblaciones neuronales específicas (Sheng y col., 1994; Chazot y Stephenson, 1997; Chatterton y col., 2002; Dunah y Standaert, 2003; Hatton y Paoletti, 2005; Brothwell y col., 2008). Además, se ha sugerido la existencia de NMDARs constituidos por subunidades NR1/NR3 (Chatterton y col., 2002; Madry y col., 2007) y por combinaciones triheteroméricas NR1/NR2/NR3 (Pérez-Otano y col., 2001; Sasaki y col., 2002).

La lectura alternativa del ARNm de la subunidad NR1 tiene un gran impacto en la estructura, función y señalización intracelular del receptor de NMDA. La subunidad NR1 presenta 8 isoformas distintas generadas por la lectura alternativa de los exones 5, 21 y 22 del gen. El exón 5 codifica para una región de 21 aminoácidos (N1) que se inserta en el residuo 190 del dominio N-terminal de la NR1. El procesamiento diferencial de los exones 21 y 22 da lugar a cambios en el extremo carboxilo de la subunidad (dominios C1, C2 y C2') (Zukin y Bennett, 1995). Se han utilizado diferentes nomenclaturas para designar las ocho variantes de la subunidad NR1, algunas relacionadas con su estructura y otras con el

orden cronológico de aparición de sus clones (Durand y col., 1993; Zukin y col., 1995). Según la nomenclatura de Durand (Durand y col., 1993), las ocho variantes de la NR1, generadas por lectura alternativa de su ARNm, se designan con subíndices que indican la presencia (1) o ausencia (0) de los exones 5, 21 y 22. Como ejemplo, la subunidad NR1₀₁₁ contendría los exones 21 y 22 pero no el 5 mientras que la NR1₁₁₁ incluiría los exones 5, 21 y 22. En la siguiente figura se muestran gráficamente las distintas variantes de la subunidad NR1 acompañadas de la nomenclatura de Durand (figura 7).

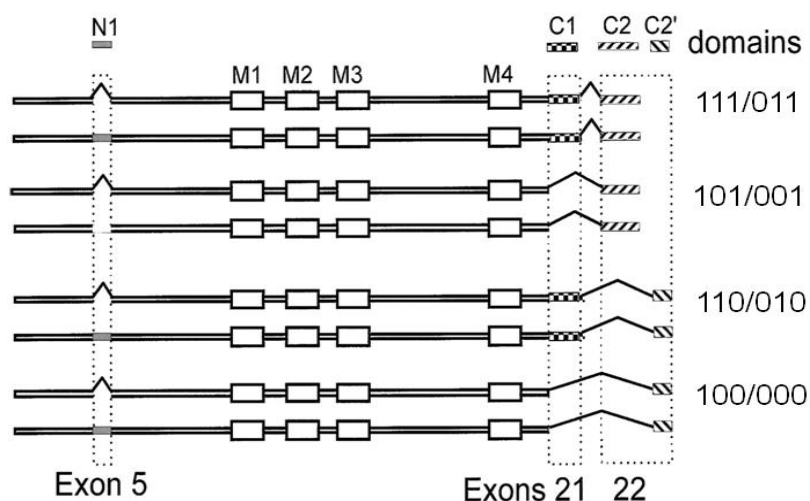


Figura 7. Variantes de la subunidad NR1 del NMDAR. Las diferentes isoformas se generan por la lectura alternativa de los exones 5, 21 y 22, dando lugar a las regiones N1, C1, C2 y C2'. Las regiones transmembrana se indican como M1, M2, M3 y M4. *Adaptado de (Dingledine y col., 1999).*

La región N1 es importante en la regulación de las propiedades del canal, ya que modifica su sensibilidad a espermina, al pH y al zinc (Dingledine y col., 1999). Por otra parte, los exones de la región C-terminal tienen un papel importante en la regulación y localización del NMDAR en la membrana celular. Así, el exón 21 comprende residuos de serina susceptibles a fosforilación por PKC y PKA que están involucrados en la regulación positiva de NR1 en respuesta a glutamato (Tingley y col., 1993; Tingley y col., 1997) y una diana para la interacción con calmodulina (CaM), que puede modular negativamente la actividad del NMDAR (Ehlers y col., 1996). Además, la región C1 presenta también sitios de interacción con neurofilamentos (Ehlers y col., 1998) y secuencias de retención en el retículo endoplásmico (Scott y col., 2001) que participan, respectivamente, en el posicionamiento y transporte de los NMDARs a la membrana. En la región C2', los

aminoácidos del extremo C-terminal constituyen un dominio de unión a proteínas PDZ (*Postsynaptic density-95/Discs large/Zonula occludens-1-binding motif*) que permiten la asociación del NMDAR en complejos proteicos en la superficie celular (Okabe y col., 1999). La interacción del segmento C2' con proteínas PDZ podría enmascarar el motivo RXR de unión al retículo endoplasmático del segmento C1, permitiendo el transporte del receptor a membrana (Standley y col., 2000). De esta forma, las isoformas de NR1 con la cola citoplasmática C-terminal más larga (NR1_{111/011}) se expresan menos a nivel de superficie que aquellas con la cola más corta (NR1_{100/000}) (Okabe y col., 1999). Adicionalmente, existe un segmento C0, muy próximo a la región transmembrana 4, presente en todas las isoformas de NR1, que contiene secuencias de internalización que afectan a la expresión de esta subunidad (Scott y col., 2004).

3.1.1. Estructura

Las subunidades del NMDAR comparten una topología de membrana común (Figura 8) que se caracteriza por:

- Un largo extremo amino extracelular que se organiza como un tándem de dos dominios: un dominio N-terminal y un dominio de unión a agonistas. El dominio N-terminal es importante en el ensamblaje de las subunidades (Meddows y col., 2001). En las subunidades NR2A y NR2B, este dominio contiene sitios de unión para inhibidores alostéricos como Zn^{2+} o ifenprodil. El segundo dominio extracelular comprende los 150 aminoácidos anteriores al primer segmento transmembrana (región S1) y el bucle entre el tercer y cuarto segmentos transmembrana (región S2). El dominio de unión a agonistas de NR2 une glutamato y el de las subunidades NR1 y NR3 el co-agonista glicina (o D-serina) (Furukawa y col., 2005; Yao y Mayer, 2006). Para la activación de los NMDARs es necesaria la unión simultánea de dos co-agonistas: glutamato y glicina (o D-serina).
- Cuatro dominios transmembrana (M1, M2, M3 y M4) que forman el canal iónico, permitiendo, tras el desbloqueo del Mg^{2+} , la salida de K^{+} y la entrada de Na^{+} y Ca^{2+} .

El dominio M2 tiene forma de horquilla y atraviesa parcialmente la membrana (Kuner y col., 1996) y confiere la selectividad iónica al canal.

- Un extremo carboxílico que aporta gran diversidad entre los receptores ionotrópicos de glutamato. Su tamaño varía en función de la subunidad. Además, proporciona múltiples sitios de interacción con numerosas proteínas intracelulares como calmodulina, proteína quinasas y fosfatasa (Dingledine y col., 1999; Mayer, 2006).

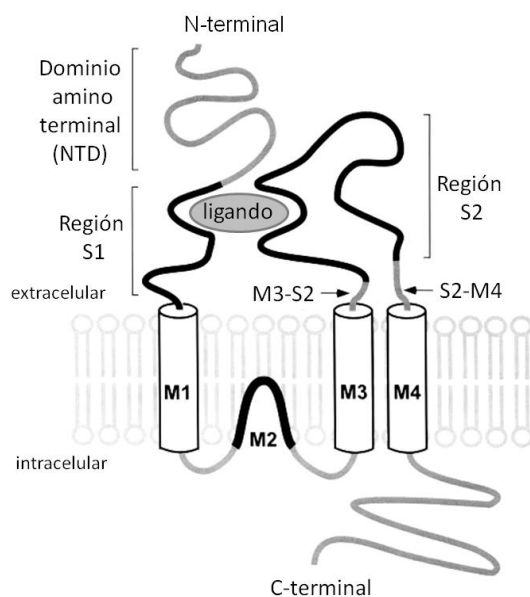


Figura 8. Topología de las subunidades del NMDAR. Caracterizada por su largo extremo amino compuesto por los dominios N-terminal y de unión a agonistas (regiones S1 y S2), los segmentos transmembranales (M1, M3 y M4) más su asa reentrante en la región del poro (M2) y el dominio C-terminal citoplasmático. *Adaptado de (Johnson, 2003).*

3.1.2. Propiedades biofísicas

El receptor de NMDA posee propiedades funcionales únicas. Presenta una cinética de activación lenta con respecto a la de los AMPARs como consecuencia de su marcada dependencia a voltaje. Con potenciales de membrana en reposo, iones Mg^{2+} del medio extracelular entran en el poro del NMDAR impidiendo el flujo iónico a través del canal (Nowak y col., 1984; Mayer y col., 1984). Es necesaria una despolarización con la suficiente amplitud y duración para que el canal se desbloquee. La activación de un gran número de aferencias o la estimulación repetitiva de la neurona presináptica libera una cantidad de glutamato suficiente para provocar una despolarización prolongada de la membrana postsináptica como consecuencia de la activación de receptores AMPA, permitiendo la activación de receptores NMDA. De esta forma, la activación de los NMDARs requiere que coincidan temporalmente la unión de sus agonistas, glutamato y

glicina, con una despolarización de membrana lo suficientemente fuerte (Seeburg y col., 1995).

La activación del NMDAR conduce a la apertura de un canal iónico selectivo para cationes que permite la entrada de iones Ca^{2+} y Na^{+} al interior celular y la salida de iones K^{+} . Aunque la mayoría de receptores de glutamato son selectivos para cationes, los receptores NMDA integrados por subunidades NR1 y NR2 tienen alta permeabilidad al calcio, mientras que la presencia de la subunidad NR3 confiere una reducción en la permeabilidad al Ca^{2+} y una menor sensibilidad al bloqueo del canal por Mg^{2+} (Sasaki y col., 2002). Por ello, esta subunidad considerada atípica actúa como un dominante negativo de la función del receptor.

La entrada de Ca^{2+} en la neurona postsináptica a través del NMDAR activa complejos de señalización intracelular asociados al receptor (Husi y col., 2000; Kennedy, 2000; Husi y Grant, 2001), que promueven la inserción en membrana de nuevos receptores AMPA (Song y Huganir, 2002), reforzando así la transmisión sináptica. Permite además una reorganización del citoesqueleto de actina que garantiza la permanencia de estos cambios (Fukazawa y col., 2003). Este fenómeno, conocido como potenciación a largo plazo, induce un cambio persistente en la eficacia sináptica y constituye la base molecular del almacenamiento de información en la sinapsis. El NMDAR también se ha relacionado con fenómenos de depresión a largo plazo (Bear y Malenka, 1994), promoviendo la defosforilación de AMPAR (Isaac, 2001) y su endocitosis (Beattie y col., 2000).

3.1.3. Distribución y localización anatómica

Los NMDARs se han localizado tanto a nivel espinal como supraespinal en diferentes estructuras de ratón, rata y humano. A nivel supraespinal, se han encontrado en hipocampo, corteza cerebral, tálamo, estriado, cerebelo y tronco del encéfalo (Dohrn y Beitz, 1994; Petralia y col., 1994a; Petralia y col., 1994b; Tolle y col., 1995; Bonnot y col., 1996). A nivel espinal, se ha demostrado la presencia del NMDAR dentro de la

sustancia gelatinosa del asta dorsal con una presencia limitada en otras zonas de la sustancia gris espinal (Kalb y Fox, 1997).

Estudios anatómicos han desvelado una estrecha relación en los patrones de distribución del MOR y del NMDAR en muchas regiones del SNC. Estos dos receptores colocalizan en parches dentro de las neuronas espinales del núcleo caudado-putamen (Wang y col., 1999), en la corteza del núcleo accumbens (Gracy y col., 1997), en neuronas del núcleo del tracto solitario (Aicher y col., 2000) y en el núcleo habenuar del tálamo (Narita y col., 2008). El receptor opioide y el NMDAR colocalizan dentro de las mismas neuronas en el SNC (Trujillo, 2002), siendo también evidente esta colocalización a nivel ultraestructural (Glass y col., 2009). Concretamente, el PAG está densamente innervado por proyecciones glutamatergicas procedentes del prosencéfalo, existiendo una fuerte colocalización MOR-NMDAR en las dendritas y soma de las neuronas del PAG ventrolateral (Commons y col., 1999; Narita y col., 2008). La literatura actual demuestra de forma convincente que MOR y NMDAR coexisten en ciertas postsinapsis y que ambos receptores muestran una interacción electrofisiológica dentro de la neurona. Por tanto, la regulación cruzada MOR-NMDAR en el control del dolor podría ser consecuencia de la presencia de ambos receptores en el mismo compartimento neuronal. También se ha visto colocalización de receptores CB1 y NMDARs (ver apartado 2.2.3, página 24).

Los NMDARs sinápticos, junto con los receptores AMPA se dirigen selectivamente a las terminales postsinápticas de las sinapsis glutamatergicas, donde se encuentran estructuralmente organizados en grandes complejos de señalización macromolecular compuestos por proteínas adaptadoras y de anclaje. Estas estructuras asocian físicamente los receptores con quinasas, fosfatasas, GPCRs y otras moléculas de señalización (Kim y Sheng, 2004; Sans y col., 2005).

3.1.4. Complejos multiproteicos de NMDAR

Los NMDARs funcionales están generalmente embebidos en la densidad postsináptica (PSD) donde establecen interacciones con múltiples proteínas de andamiaje

y señalización, generando los complejos multiproteicos de NMDAR. Estos complejos están compuestos por más de 77 proteínas (Husi y col., 2000) entre las que destacan:

- **CaMKII:** es la proteína de señalización más abundante en la PSD. La activación de los NMDARs resulta en la entrada de Ca^{2+} que, junto con la CaM, activan la CaMKII. La activación de la CaMKII tiene como consecuencia la autofosforilación de la quinasa en la treonina 286 y un aumento de su localización en la PSD y de su asociación con el NMDAR (Shen y Meyer, 1999; Leonard y col., 1999; Dosemeci y col., 2001). La CaMKII se une a las subunidades NR1, NR2A y NR2B de los NMDARs (Leonard y col., 1999; Gardoni y col., 1999). Aunque la unión de la CaMKII a la subunidad NR2B no requiere la autofosforilación de la quinasa en la treonina 286 (Lisman y col., 2002), la estimulación del NMDAR aumenta la asociación entre ambas (Leonard y col., 1999).
- **Proteína de densidad postsináptica 95 o PSD-95:** uno de los grupos proteicos más abundantes en la PSD es la familia de las MAGUKs (*Membrane-Associated GUanylate KInases*) (Funke y col., 2005), que incluye la PSD-95, PSD-93, SAP-97 y SAP102. Estas proteínas se caracterizan por la presencia en su secuencia de tres dominios PDZ, un dominio SH3 (*Src Homology domain 3*) y un dominio GK (*Guanylate Kinase-like domain*). A través de sus dominios PDZ las MAGUKs se unen directamente a los NMDARs, interaccionando con los dominios de unión a PDZ presentes en los extremos C-terminales de las subunidades NR2 y de las isoformas de NR1 que contienen la región C2' (Kornau y col., 1995; Kim y col., 2004). Las MAGUKs ponen en contacto los receptores de NMDA con proteínas de señalización, de regulación, del citoesqueleto, de adhesión y con otros receptores de glutamato y canales iónicos presentes en la PSD. Entre otras, la PSD-95 se une a la proteína de señalización nNOS a través de su segundo dominio PDZ y al NMDAR por su primer dominio PDZ (Cao y col., 2005), acoplando la nNOS a la subunidad NR2 del NMDAR; la PSD-95 también se asocia a la proteína de señalización SynGAP (Kim y col., 1998). En cuanto a las proteínas reguladoras, las MAGUKs ponen en contacto al receptor con proteínas de la familia de las proteína tirosina quinasas no receptoriales

(NRTKs). Así, la asociación de Fyn con MAGUKs aumenta la fosforilación de NR2B en el residuo de tirosina 1472, impidiendo la interacción de NR2B con AP-2 (*Activating Protein 2*) y evitando la internalización del receptor (Dunah y col., 2004; Prybylowski y col., 2005). Además, la PSD-95 regula la fosforilación de NR2A por Fyn, Src y otras quinasas, modulando la función y tráfico del receptor.

- **Otras proteínas de los complejos de NMDAR:** otras proteínas de anclaje presentes en el complejo multiproteico de NMDAR son las AKAPs (*A-Kinase Anchoring Proteins*). Las AKAPs son una familia de proteínas funcionalmente relacionadas que se caracterizan por su interacción con las subunidades reguladoras (RI y RII) de la PKA. Una de las propiedades más interesantes de estas proteínas es su capacidad de anclar simultáneamente quinasas y fosfatasas (Faux y Scott, 1996). AKAP79 interacciona con PKA, PKC y la fosfatasa dependiente de Ca^{2+} -CaM, PP2B (Klauck y col., 1996). Varios estudios funcionales sugieren que AKAP79 mantiene estas enzimas cerca de la membrana plasmática para regular el estado de fosforilación y la actividad de proteínas transmembrana como canales iónicos (Fraser y Scott, 1999). Las AKAPs también pueden regular la actividad de las enzimas que lleva asociadas. En la PSD, AKAP79 lleva asociadas PKCs inactivas. La formación de complejos Ca^{2+} -CaM por activación del NMDAR rompe esta asociación (Faux y Scott, 1997), fomentando la translocación de la quinasa a membrana. La fosforilación de NMDAR por PKC aumenta la función NMDAR (Zou y col., 2004).

La PP1 y la PKA se encuentran formando un complejo con la subunidad NR1 del NMDAR a través de la proteína de anclaje Yotiao (Westphal y col., 1999), miembro de la familia de las AKAPs. La fosfatasa está unida a Yotiao en estado activo, limitando la actividad del canal de NMDAR (Westphal y col., 1999). La generación de AMPc activa la PKA, que inhibe la PP1. La PP1 defosforila e inactiva la CaMKII cuando los niveles de Ca^{2+} caen hasta un nivel basal (Bradshaw y col., 2003), por tanto, inhibiendo la acción de PP1, PKA prolonga la actividad de la CaMKII (Blitzer y col., 1998; Makhinson y col., 1999). Además, la PKA puede potenciar la actividad del NMDAR fosforilando residuos de serina y treonina de las subunidades NR1, NR2A y NR2B (Crump y col., 2001).

3.1.5. Regulación entre GPCRs y NMDARs

La función de los NMDARs está regulada por un equilibrio entre la fosforilación y defosforilación de aminoácidos específicos localizados en las colas citoplasmáticas de las subunidades del receptor. Src y Fyn fosforilan residuos de tirosina de las subunidades NR2A y NR2B, y probablemente también de subunidades NR3A/B (Salter y Kalia, 2004). PKC y PKA también fosforilan residuos de serina y treonina de las regiones citosólicas de las subunidades NR1 y NR2. Concretamente, la subunidad NR1 es fosforilada en la S890 y S896 por PKC y en la S897 por PKA (Chen y Roche, 2007) (figura 9). Se ha demostrado que la fosforilación de la NR1 por PKC puede deberse a distintas isoformas de la quinasa, siendo la serina 896 fosforilada por PKC α y la serina 890 por PKC γ (Sánchez-Pérez y Felipo, 2005).

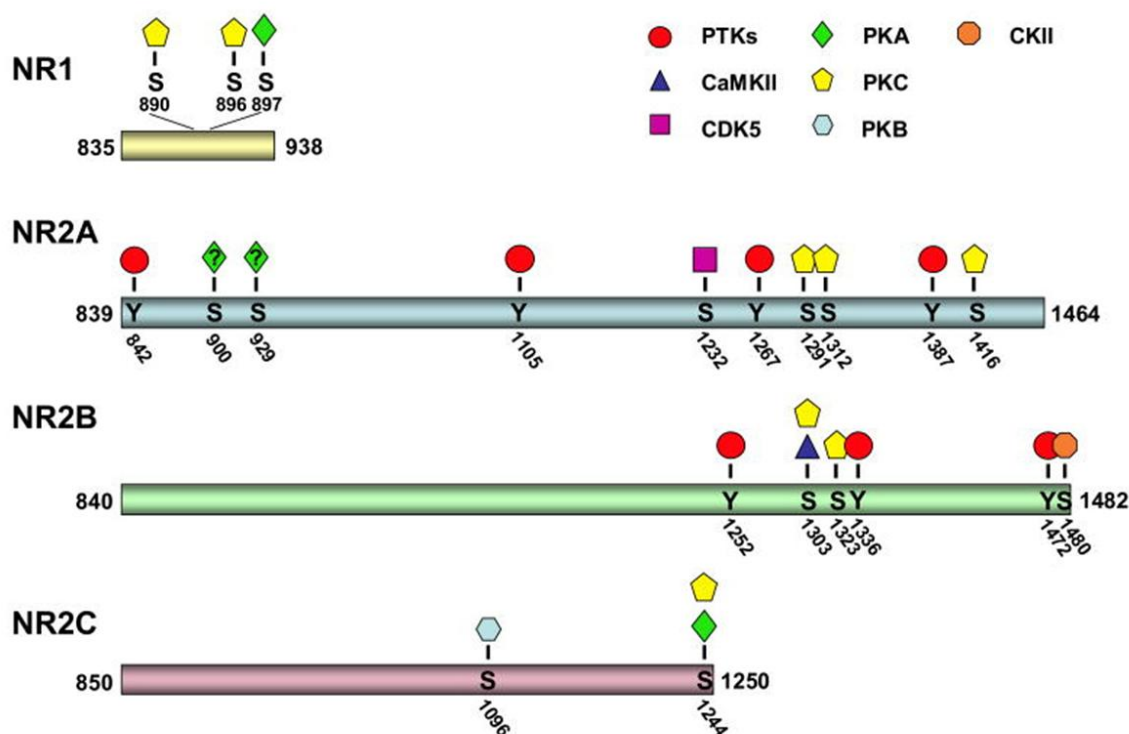


Figura 9. Sitios de fosforilación de las colas citoplasmáticas de las subunidades del NMDAR. Las colas citoplasmáticas de las subunidades del receptor NMDA: NR1, NR2A, NR2B y NR2C, contienen aproximadamente 100, 630, 640 y 400 aminoácidos respectivamente. Cada cola es fosforilada en residuos de serina/treonina y/o tirosina por una variedad de quinasas. Entre los sitios de fosforilación identificados, la NR2A es la única fosforilada por CDK5, la NR2B por CKII y la NR2C por PKB. *Adaptado de (Chen y col., 2007).*

La activación de ciertos GPCRs puede regular la actividad del NMDAR mediante cascadas de señalización que modulan el grado de fosforilación del receptor de glutamato. En general, esta regulación se ha relacionado con la activación de determinadas NRTKs como Src y Fyn y con serina/treonina quinasas como PKC (Lu y col., 1999). Las quinasas Src, Fyn, Lck, Lyn y Yes se encuentran en la PSD y todas, excepto Lck, forman parte de los complejos postsinápticos de NMDAR en cerebro y médula espinal (Yu y col., 1997; Yaka y col., 2002; Kalia y Salter, 2003). Por tanto, Src, Fyn, Lyn y Yes tienen una localización adecuada para poder regular la función NMDAR. En particular, la Src parece ser crucial para la activación del NMDAR por NRTKs, ya que la inhibición selectiva de Src mediante la utilización del anticuerpo inhibidor anti-Src1 o del péptido inhibidor Src (40-58) disminuyó las corrientes mediadas por el NMDAR y la apertura del canal; los mismos cambios se observaron cuando se usó un inhibidor general de las NRTKs, el anticuerpo anti-cst 1 (Roche y col., 1995; Yu y col., 1997). En el SNC, ciertos GPCRs pueden promover la activación de la tirosina quinasa Src. De hecho, los GPCRs potencian las respuestas mediadas por el NMDAR a través de la activación de PKC (Chen y Huang, 1991), pero solamente si la Src interacciona con las subunidades NR2 del NMDAR, fosforilándolas (Lu y col., 1999; Grosshans y Browning, 2001). En neuronas hipocámpales, la potenciación de la actividad NMDAR inducida por los receptores muscarínicos M1 se bloquea tras la inhibición de PKC y Src, sin embargo, la inhibición de la PKC no altera el aumento de la respuesta del NMDAR por Src mientras que la inhibición de la Src deprime la activación mediada por PKC; es más, en neuronas de ratones KO para Src, la PKC no potencia la función NMDAR (Lu y col., 1999), lo que indica que PKC y Src son componentes de la misma cascada de señalización y que los efectos de la PKC en lo que se refiere al NMDAR requieren de la Src. Los receptores metabotrópicos de glutamato 5 (mGluR5) también promueven la potenciación del NMDAR activando una cascada de señalización compuesta por PLC/Ca²⁺/PKC/Pyk2/Src en neuronas piramidales de hipocampo (Benquet y col., 2002; Kotecha y col., 2003). Los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (mGluR1 y mGluR5) están asociados a los NMDARs en la PSD por medio de las proteínas Homer/GKAP/PSD-95 (Roche y col., 1999; Tu y col., 1999; Naisbitt y col., 1999). Esta proximidad permite la liberación localizada de Ca²⁺ y la modulación de la actividad de quinasas dependientes de Ca²⁺ y

fosfatasas que causan la regulación recíproca entre ambos receptores. A la inversa, la activación de los NMDARs también puede regular las respuestas de los mGluRs, concretamente de los del grupo I (Alagarsamy y col., 2002).

El MOR también activa la Src asociada a los complejos postsinápticos de NMDAR vía PKC. La PKC activada por MOR debilita la interacción de la Src con subunidades $G_{\alpha z}$ -GDP, facilitando su unión con las $G_{\alpha i2}$ -GTP y su activación por autofosforilación en la tirosina 416 (Sánchez-Blázquez y col., 2009). En estas circunstancias, la Src activada fosforila residuos específicos de las subunidades NR2A y NR2B (Salter y col., 2004), produciendo un aumento de la permeación de iones Ca^{2+} hacia el citosol de la postsinapsis. El aumento del flujo de Ca^{2+} recluta CaM (Gerendasy y Sutcliffe, 1997) y promueve la formación de complejos Ca^{2+} -CaM necesarios para la propagación de las señales generadas tras la unión de glutamato/glicina a los NMDARs. Los complejos de Ca^{2+} -CaM formados desplazan la PKC inactiva de las proteínas de anclaje AKAPs, aumentando su translocación a la membrana (Newton, 1997). Esto se ha documentado para la PKC γ , que se expresa exclusivamente en neuronas de cerebro y médula espinal (Saito y Shirai, 2002), y que ha sido implicada en la desensibilización de los MORs (Narita y col., 2001; Zeitz y col., 2001). La Ca^{2+} -CaM también se une a PLC β (McCullar y col., 2003), potenciando la activación de la fosfolipasa (McCullar y col., 2007) y, por tanto, aumentando la activación de la PKC de manera dependiente de Ca^{2+} y DAG. De esta forma, los MORs pueden causar la regulación positiva de los NMDARs mediante un mecanismo de dos pasos que requiere la activación de Src por PKC, seguido de la translocación de PKC activa a las proximidades del NMDAR.

Los receptores dopaminérgicos D1 (D1R) también potencian la actividad de los NMDARs mediante la activación de cascadas de señalización, como la dependiente de AMPc/PKA; en estriado, esta cascada promueve la fosforilación y activación del inhibidor de proteína fosfatasas DARPP-32 (Colwell y Levine, 1995; Blank y col., 1997; Flores-Hernández y col., 2002). El DARPP-32 fosforilado es un potente inhibidor de PP1, que regula la fosforilación de subunidades NR1 (Snyder y col., 1998). En neuronas hipocámpales, la PP1 está inhibida por una proteína diferente, el inhibidor 1, que también

es sustrato de PKA (Allen y col., 2000). Por tanto, la activación de PKA lleva a la inhibición de PP1 y a una menor defosforilación del NMDAR. Se ha descrito la existencia de una interacción directa entre secuencias contenidas en la cola citoplasmática de los receptores D1 y las subunidades NR1 y NR2A del NMDAR, importante para la regulación funcional entre ambos receptores (Lee y col., 2002). La interacción entre D1R-NR2A está implicada en la disminución de la actividad NMDAR como consecuencia de la reducción del número de receptores NMDA en la superficie celular; la interacción con la subunidad NR1 se ha relacionado con la atenuación de la excitotoxicidad mediada por los NMDARs a través de una cascada dependiente de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K). La interacción D1R-NR1 también permite la inserción de receptores D1 en membrana tras la activación del NMDARs (Pei y col., 2004). Un estudio reciente demuestra que los receptores mGluR5a y el NMDAR también pueden interaccionar directamente. Esta asociación proteína-proteína tiene lugar entre el extremo C-terminal del receptor metabotrópico y las subunidades NR1₀₁₁ o NR2B del NMDAR y conlleva la inhibición de la función de ambos receptores (Perroy y col., 2008).

Otros receptores de dopamina, concretamente los de clase 2 (D2, D3, D4) también modulan la función NMDAR. En neuronas hipocámpales de la región CA1, la administración de quinpirol (un agonista selectivo de los receptores dopaminérgicos de clase 2) inhibe la transmisión excitatoria mediada por el NMDAR promoviendo la liberación de Ca^{2+} intracelular y aumentando la inactivación dependiente de Ca^{2+} de los NMDARs mediante la transactivación de receptores de tirosina quinasas (Kotecha y col., 2002). La activación del CB1R también se ha relacionado con una inhibición de la neurotransmisión excitatoria debida al NMDAR. En general, se piensa que la liberación postsináptica de endocannabinoides activa receptores CB1R presinápticos que disminuyen la liberación o recaptación de glutamato modulando así la entrada de Ca^{2+} a través del NMDAR (Brown y col., 2003; Melis y col., 2004; Li y col., 2010). Otros han propuesto que el CB1R puede regular la actividad NMDARs en la misma neurona postsináptica, disminuyendo la entrada de Ca^{2+} a través del canal de NMDAR mediante la modulación de la liberación de Ca^{2+} intracelular (Liu y col., 2009; Hampson y col., 2011).

4. PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN CRUZADA ENTRE GPCRs Y NMDARs

La interacción funcional entre MOR y NMDAR es de gran importancia en la regulación de la actividad opioide. Es de destacar que el secuestro de la transducción regulada por MOR requiere que se produzca un aumento de la actividad del NMDAR. Una cadena de proteínas de señalización lleva información del receptor MOR, activado por morfina, al NMDAR; entre ellas se encuentra la PKC γ activada por MOR y la Src, que gracias a la acción de la PKC γ pasa del control de la G α_z al de las G α_i , donde se activa por fosforilación en la Tyr416 (Sánchez-Blázquez y col., 2009). Como resultado, PKC y Src aumentan la actividad NMDAR actuando sobre residuos citosólicos específicos de la subunidades del receptor de glutamato, como la Ser890NR1, la Tyr1325NR2A y la Tyr1472NR2B, activando a la CaMKII (Garzón y col., 2008; Sánchez-Blázquez y col., 2009; Rodríguez-Muñoz y col., 2010).

Una proteína importante en la regulación de la PKC, es la *Histidine triad Nucleotide-binding protein 1*, también llamada HINT1 o proteína inhibidora de PKC (PKCi). La proteína HINT1 se aisló por primera vez de cerebro bovino, identificándose como un potente inhibidor de PKC (McDonald y Walsh, 1985; Pearson y col., 1990). La HINT1 se une al extremo citosólico del receptor opioide atenuando la desensibilización del receptor e inhibiendo la fosforilación del mismo debida a PKC (Guang y col., 2004). Es más, en ratones transgénicos carentes de HINT1 la expresión y actividad enzimática de PKC está aumentada (Varadarajulu y col., 2011). Por otro lado, ensayos de doble híbrido en levaduras han demostrado que HINT1 también interacciona específicamente con la región N-terminal de las proteínas RGSZ1 (RGS20) y RGSZ2 (RGS17) (Ajit y col., 2007); de esta forma, la HINT1 y las RGSZ podrían modular conjuntamente la actividad del receptor opioide.

4.1. HINT1

La HINT1 es una proteína intracelular de 126 aminoácidos que forma parte de la superfamilia de la tríada de histidinas (HIT), cuyos miembros se caracterizan por contener

en su secuencia el motivo histidinaXhistidinaXhistidina (siendo X un aminoácido hidrofóbico) (Brenner, 2002). Estudios filogenéticos dividen la superfamilia HIT en cinco ramas: proteínas FHIT (*Fragile Histidine Triad*), proteínas HINT, galactosa 1-fosfato uridiltransferasa o GalT, aprataxina y pirofosfatasa DcpS (Kijas y col., 2006; Ahel y col., 2006). Entre ellas, la rama de las proteínas HINT es la más conservada, y está presente en un amplio rango de organismos, como micoplasmas, bacterias, plantas y mamíferos. Análisis de la estructura de las proteínas HIT por cristalografía de rayos X y ensayos enzimáticos *in vitro* sugieren que estas proteínas pueden funcionar como nucleotidil hidrolasas y fosfotransferasas (Lima y col., 1997).

Los datos obtenidos de estudios estructurales, ensayos de doble híbrido en levaduras y la purificación bioquímica de HINT1 muestran que esta proteína existe en forma de homodímero (Pearson y col., 1990; Lima y col., 1996; Klein y col., 1998) (figura 10). Contiene un grupo de residuos de unión a zinc, capaz de unir otras proteínas, y una fuerte carga negativa (Lima y col., 1996).

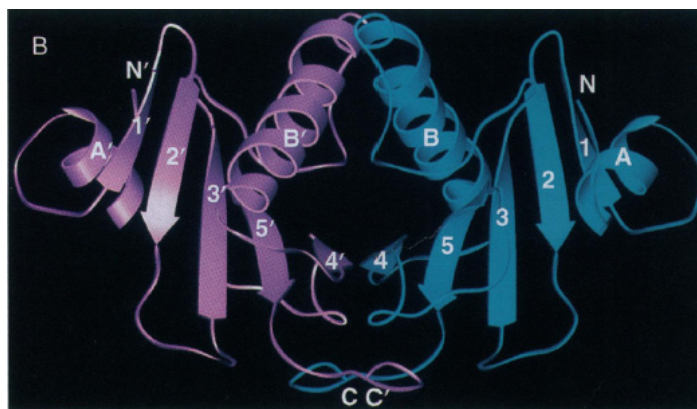


Figura 10. Representación esquemática en 3D de un homodímero de HINT1. Cada monómero tiene dos hélices α (A y B, A' y B') y cinco láminas β (1-5, 1'-5'). La superficie de contacto de ambos monómeros, formada por las hélices B-B' enfrentadas y los extremos C-terminales (C-C'), constituyen un núcleo altamente hidrofóbico. La tríada de histidinas, donde se une el zinc, está próxima a los extremos C-terminales. *Adaptado de (Lima y col., 1996).*

La HINT1 está ampliamente distribuida en muchos tejidos, como cerebro, hígado y riñón. Se localiza de forma ubicua en todo el SNC, siendo especialmente abundante en sistema olfatorio, corteza cerebral, hipocampo y parte del tálamo, hipotálamo,

mesencéfalo, puente troncoencefálico y médula (Liu y col., 2008). La expresión generalizada de HINT1 en el SNC sugiere que esta proteína puede ser necesaria para el funcionamiento neuronal normal y que, por tanto, su desregulación puede llevar a situaciones patológicas. De hecho, se ha observado una menor expresión de HINT1 en corteza prefrontal de pacientes esquizofrénicos (Vawter y col., 2002; Vawter y col., 2004) y con trastorno bipolar (Elashoff y col., 2007). Ratones sin HINT1 presentan una mayor locomoción en respuesta a anfetamina y al agonista dopaminérgico apomorfina con respecto a sus congéneres *Wild-Type* (WT) (Barbier y col., 2007), lo que sugiere que la falta de HINT1 podría estar asociada con una disfunción de la transmisión postsináptica dopaminérgica y concuerda con la posible participación de esta proteína en esquizofrenia. La HINT1 también se ha implicado en procesos de carcinogénesis como supresora de tumores (Su y col., 2003; Li y col., 2006), inhibiendo el factor de transcripción AP-1 y suprimiendo la transcripción mediada por TCF- β -catenina mediante su interacción con pontina y reptina (Weiske y Huber, 2005; Wang y col., 2007).

Como he comentado anteriormente, la HINT1 tiene un papel importante en la regulación del MOR; resultados de nuestro grupo indican que la unión de HINT1 al extremo citosólico de MOR permite el reclutamiento de PKC, principalmente PKC γ , al receptor activado por morfina. Entonces, el DAG producido por la acción de los dímeros G $\beta\gamma$ libres sobre las PLC β activa la PKC γ que fosforila al receptor disminuyendo su actividad. Consecuentemente, en ratones *Knock-Down* (KD) para HINT1 la morfina produce un efecto analgésico mayor y no se detecta el complejo PKC-MOR ni la fosforilación del receptor debida a esta quinasa; sin embargo, estos ratones desarrollan una profunda tolerancia (Rodríguez-Muñoz y col., 2008). Del mismo modo, se ha observado que ratones KO para HINT1 presentan una mayor respuesta analgésica a la morfina y una tolerancia más duradera a los efectos del opioide que ratones WT (Guang y col., 2004).

4.2. RGSZ2

La proteína reguladora de la señalización de proteínas G RGSZ2, de unos 24 kDa, está muy conservada entre especies, con un 90 % de homología entre humano, rata,

pollo y ratón (Mao y col., 2004). Es miembro de la subfamilia RGS-RZ, que incluye las proteínas RGS17/Z2, RGS19/GAIP, RGS20/Z1 y la variante de la RGSZ1, Ret-RGS (Ross y Wilkie, 2000). Las cuatro proteínas de esta subfamilia están codificadas por tres genes diferentes Rgs17, Rgs19 y Rgs20, a partir de los que se generan varias isoformas por lectura alternativa (Barker y col., 2001; Doupnik y col., 2001). Los genes Rgs17 y Rgs20 están localizados en el genoma muy próximos a los genes de los receptores MOR y KOR respectivamente (Sierra y col., 2002). Los miembros de esta subfamilia son proteínas pequeñas (de 20-30 KDa, con la excepción de Ret-RGS que tiene 45 KDa) con extremo carboxilo muy corto (de 10-11 aminoácidos) y un dominio rico en cisteínas en su extremo N-terminal, que se puede palmitoilar ayudando a su localización en la membrana (De Vries L. y col., 1996). El dominio rico en cisteínas está muy conservado y también es importante para la interacción con otras proteínas (Fischer y col., 2003).

La RGSZ2 se localiza en áreas específicas del SNC de ratón. Mediante ensayos de inmunoprecipitación y RT-PCR se han detectado niveles altos del ARNm de RGSZ2 y de la proteína en hipotálamo, PAG, y en la región pontina-medular; más bajos en tálamo, corteza y médula, con las señales más débiles en estriado y cerebelo (Garzón y col., 2005c).

Interacciona con proteínas de la familia Gai (Gai/o y Gaz) y con Gaq en estudios *in vitro* y ensayos de doble híbrido en levaduras, ejerciendo una buena actividad GAP sobre ellas (a excepción de Gaq) (Mao y col., 2004). Aunque la actividad GAP de RGSZ2 no parece ser selectiva, presenta una ligera preferencia por subunidades Gao y Gaz (Nunn y col., 2006). Las RGS-RZ presentan la singular característica de unirse con afinidad similar a proteínas Gα activadas (unidas a GTP) o en estado de transición (Gα-GDP.P), pudiendo inhibir la activación de efectores mediada por las subunidades Gα-GTP (Wang y col., 1997). Así, tras la activación del receptor, las proteínas RGS-RZ pueden secuestrar subunidades Gα activadas, impidiendo su reasociación con los dímeros Gβγ y evitando su interacción con efectores.

Las proteínas de la subfamilia RZ contienen varios sitios de N y O-glicosilación así como residuos de serina, treonina y lisina susceptibles de fosforilación, que sugieren una regulación compleja de su actividad. De hecho, RGSZ2 contiene tres sitios potenciales de fosforilación por caseína quinasa 2 y seis por PKC (Mao y col., 2004). Estas proteínas también tienen la capacidad de incorporar SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifiers*). Todos los miembros de la subfamilia RGS-RZ contienen al final de la hélice $\alpha 4$ del dominio RGS un sitio de unión a SUMO (Rodríguez-Muñoz y col., 2007a). Además, la proteína RGSZ2 contiene dos motivos de interacción no covalente con SUMO (SIMs), uno antes del dominio RGS (IQVL, 64-67) y otro al final de la hélice $\alpha 5$ de este dominio (ISIL, 141-144) (Garzón y col., 2011b). Se ha propuesto que la conjugación de SUMO con las RGS-RZ puede alterar su función como GAPs. De hecho, un estudio reciente de nuestro grupo ha demostrado que la unión covalente de SUMO con los residuos del final de la caja RGS bloquea la actividad GAP de la RGSZ2 permitiéndola actuar como antagonista de efectores, al retrasar la liberación de subunidades $G\alpha$ -GDP e impedir su control por los GPCRs.

La RGSZ2 y, en menor medida, la RGSZ1 tienen un papel esencial en la regulación de las subunidades $G\alpha$ activadas por morfina. Tras la administración del opioide se produce una transferencia dosis dependiente de subunidades $G\alpha i/o/z$ del MOR a RGSZ1 y RGSZ2, concretamente, las $G\alpha z$ se unen en mayor proporción a las RGSZ2. La asociación de las $G\alpha z$ con las RGSZ2 persiste más allá del cese de la actividad nociceptiva ejercida por la morfina, por tanto, parte de las subunidades $G\alpha z$ activadas por MOR son retenidas por este regulador, contribuyendo al desarrollo de tolerancia aguda a morfina. En contraposición, las RGSZ1 apenas coprecipitan con subunidades $G\alpha z$, por lo que probablemente solo actúan como GAPs catalizando su desactivación. Consecuentemente, en animales con una expresión reducida de RGSZ2 aumenta enormemente la influencia de las $G\alpha z$ -GTP sobre sus efectores, de ahí que la administración de una dosis alta de morfina promueva una rápida desensibilización del MOR, que se desarrolla durante el transcurso del efecto analgésico del opioide (Garzón y col., 2005c). La falta de RGSZ1 fomenta el desarrollo de una mayor tolerancia aguda a

morfina, aunque de menor intensidad que la observada en ratones KD para RGSZ2 (Garzón y col., 2004).

La RGSZ2 también juega un papel importante en la regulación cruzada entre el MOR y el NMDAR. La activación del receptor opioide por morfina, induce la unión de la nNOS al dominio PDZ de la RGSZ2 (Garzón y col., 2011a), al tiempo que promueve la activación de la nNOS a través de la cascada MOR/PI3K/Akt (Sánchez-Blázquez y col., 2010). Es la nNOS asociada a la membrana plasmática pero no al MOR la que se activa por fosforilación de la Akt, por lo que la interacción nNOS-RGSZ2 reduce el impacto de la nNOS/NO (óxido nítrico) activada por morfina en la vía del NMDAR/CaMKII (Sánchez-Blázquez y col., 2010). Así, en ratones con una expresión reducida de RGSZ2, morfina causa una sobreactivación de la vía nNOS/NO/NMDAR/CaMKII que origina una rápida fosforilación del MOR, desacoplamiento de su transducción y desarrollo de tolerancia al efecto analgésico de la morfina. La analgesia opioide se recupera al normalizar los niveles de RGSZ2, o por inhibición de PKC, CaMKII o antagonismo del NMDAR (Garzón y col., 2011a).

Objetivos

Los opioides tipo morfina son las sustancias más eficaces en el tratamiento del dolor de alta intensidad, aunque pueden presentar algunas limitaciones en el caso del dolor de origen neuropático. Son fármacos terapéuticamente válidos y su costo es muy asequible, sin embargo, un uso inadecuado puede originar tolerancia a sus efectos analgésicos. En estas circunstancias, se suele recurrir a elevar sus dosis para obtener los efectos deseados con el riesgo que esto conlleva de aparición de efectos tóxicos colaterales que pueden llegar a comprometer la salud del paciente. Esta limitación en su uso justifica el interés de conocer la naturaleza de los mecanismos que llevan a la desensibilización de los receptores opioides, para luego poder interferir eficazmente en su función y así poder salvar este inconveniente. Este trabajo de Tesis parte del conocimiento que han aportado a lo largo de los años numerosos grupos de investigación, incluido el nuestro, y que vincula la declinación de la función MOR con el aumento de la actividad del receptor glutamatérgico NMDAR. Proceso en el que participan diferentes vías de señalización intracelular en las que proteínas G, RGS y diferentes quinasas desempeñan un papel importante (Chen y col., 1991; Heinricher y col., 2001; Garzón y col., 2008). El aumento de función NMDAR se traduce a su vez en control negativo del MOR, lo que conlleva la aparición de tolerancia a los efectos analgésicos de compuestos opioides como la morfina. Este mecanismo molecular incluye la activación de la CaMKII mediada por NMDAR (Sánchez-Blázquez y col., 2008), que facilita la acción ya caracterizada de RGS y proteínas tipo fosducina sobre la transducción del receptor opioide (Garzón y col., 2002; Rodríguez-Muñoz y col., 2007c; Sánchez-Blázquez y col., 2008). Por tanto, sobre la base de un mecanismo principal responsable del desarrollo de tolerancia a la morfina en SN, el receptor NMDA tendría un papel fundamental.

Como objetivo principal, esta tesis doctoral pretende profundizar en las bases moleculares que sustentan el mecanismo de desensibilización de MOR por NMDAR. Mediante técnicas de inmunoprecipitación del MOR y de subunidades del NMDAR se estudiará la presencia de proteínas de señalización que puedan coprecipitar con ellos. Tras su identificación, se procederá a estudiar la estabilidad de su asociación con estos receptores en función de su activación farmacológica *in vivo* y estudio *ex vivo* en preparaciones de sinaptosomas. Se continuará el estudio delimitando los segmentos o

secuencias proteicas que pudiesen estar directamente implicados en esta asociación. Se aplicarán las técnicas descritas en Métodos: esencialmente, estudios de inmunoprecipitación *ex vivo* sobre sinaptosomas; *in vitro*, interacciones mediante proteínas recombinantes y “pull-down”, en el que la proteína cebo arrastra a la unida, y estudio de la interacción de secuencias en tiempo real mediante resonancia de plasmón superficial (*Surface Plasmon Resonance* o SPR). Asimismo, se determinará la posibilidad de que estas uniones puedan tener lugar en células vivas mediante la expresión de ambas proteínas en células en cultivo y seguimiento de su unión por fluorescencia inducida por su acoplamiento bimolecular (*Bimolecular Fluorescence Complementation* o BiFC). En los casos en que los estudios *in vitro* muestren que la asociación *ex vivo* no responde a una asociación directa, intentaremos determinar que proteína o proteínas sustentan la interacción observada. Procediendo del mismo modo que con el MOR, haremos extensivo este estudio a otro GPCR, concretamente al receptor CB1. Los objetivos concretos del estudio se pueden resumir en los siguientes apartados:

1.- Estudio de la posible interacción directa entre receptores opioide Mu y glutamato NMDA. Se inmunoprecipitarán ambos receptores en preparaciones de sinaptosomas obtenidas a partir de diferentes regiones del sistema nervioso. Se estudiará la posible coprecipitación de subunidades del NMDAR con el MOR y viceversa. Se clonarán el receptor opioide Mu y aquellas subunidades del NMDAR que hayan dado positivo en esta asociación para su estudio en sistemas *in vitro* donde podamos determinar si la asociación observada en el tejido nervioso solubilizado responde a una interacción física directa. Se prestará atención especial a su estudio en regiones como la sustancia gris periacueductal (*PeriAquaductal Grey matter* o PAG) y a la estabilidad de esta asociación en función de la activación farmacológica del MOR y del NMDAR.

2.- Análisis de la conexión del receptor cannabinoide CB1 con el de NMDA en SN de ratón. La literatura demuestra la conexión negativa funcional entre ambos receptores, por lo que procederemos como en el apartado 1, aplicando técnicas similares para el estudio de su conexión molecular y análisis de su posible interacción. Se prestará atención especial al proceso de internalización del CB1R inducido por agonistas y su posible

regulación por el tono NMDAR. Asimismo, se determinará la influencia de la internalización del CB1R en la estabilidad del NMDAR.

3.- Determinar la presencia del módulo de señalización HINT1-RGSZ2 en el extremo C-terminal de los receptores opioide Mu y cannabinoide CB1. Papel de la PKC en la dinámica de asociación HINT1-RGSZ2. Se realizarán ensayos de inmunoprecipitación a partir de preparaciones de sinaptosomas de PAG con el objetivo de detectar la presencia del módulo de señalización HINT1-RGSZ2 asociado a estos receptores. Mediante ensayos de SPR y coprecipitación, analizaremos cómo se ensamblan entre sí las proteínas HINT1 y RGSZ2 y el complejo formado con el extremo C-terminal del MOR y CB1R. Estos estudios se complementarán con ensayos BiFC. Posteriormente, evaluaremos el papel de la PKC y de subunidades G α 2/z activadas en la dinámica de asociación HINT-RGSZ2 así como el efecto de la administración *in vivo* de agonistas/antagonistas en la estabilidad de la asociación MOR/CB1R-HINT1-RGSZ2.

4.-Influencia de la vía CB1R-NMDAR en los efectos analgésicos supraespinales de los cannabinoides. Se evaluará el efecto analgésico y el desarrollo de tolerancia tras la administración de WIN55.212-2. Utilizando ratones *knock-out* para HINT1 y *knock-down* para RGSZ2, se valorará el papel de las proteínas HINT1 y RGSZ2 en la respuesta analgésica y en el desarrollo de tolerancia cannabinoide. Por otra parte, se estudiará el efecto del antagonista del NMDAR, MK-801, en la antinocicepción y tolerancia analgésica inducida por WIN55.212-2 en ratones CD1 y *wild-type/knock-out* para HINT1. De esta manera, se evaluará la participación de HINT1 en la regulación que ejerce el NMDAR sobre la analgesia y tolerancia cannabinoide.

Parte del trabajo realizado ha dado lugar a las siguientes publicaciones en revistas especializadas e indexadas. Se anexan a esta Tesis Doctoral:

- Garzón J, de la Torre-Madrid E, Rodríguez-Muñoz M, **Vicente-Sánchez A**, Sánchez-Blázquez P. Gz mediates the long-lasting desensitization of brain CB1 receptors and is essential for cross-tolerance with morphine. *Mol. Pain* 5:11-21 (2009). I. F. 4,19

- Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, **Vicente-Sánchez A**, Bailón C, Martín-Aznar B, Garzón J. The histidine triad nucleotide-binding protein 1 supports mu-opioid receptor-glutamate NMDA receptor cross-regulation. *Cell Mol Life Sci*. 68(17):2933-49 (2010). I.F. 7,047
- Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, **Vicente-Sánchez A**, Bailón C, Martínez-Murillo R, Sánchez-Blázquez P. RGSZ2 binds to the nNOS PDZ domain to regulate Mu-opioid receptor-mediated potentiation of the NMDAR-CaMKII pathway. *Antioxid Redox Signal*. 15(4):873-87 (2011). I.F. 8,209
- Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, **Vicente-Sánchez A**, García-López M, Martínez-Murillo R, Fischer T, Sánchez-Blázquez P. SUMO-SIM interactions regulate the activity of RGSZ2 proteins. *PLoS One* 6(12):e28557 (2011). I.F. 4,411
- Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, **Vicente-Sánchez A**, Berrocoso E, Garzón J. The Mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: implications in pain control. *Neuropsychopharmacology* 37(2):338-49 (2012). I.F. 6,689

Materiales y métodos

1. Materiales

1.1. Animales de experimentación

En este estudio se utilizaron ratones macho no consanguíneos, variedad albina, cepa CD1 Swiss (*Charles River, Laboratorios España, S.A., Barcelona, España*). También se emplearon ratones WT y KO para la proteína HINT1 con un 96 % de fondo genético procedente de la cepa 129/SvJ (gentilmente cedidos por el Dr. Weinstein I.B. y la Dra. Wang J.B.); en los que se había sustituido el primer exón del gen que codifica para la HINT1 por un *cassette* de resistencia a neomicina (PGKneo) según el procedimiento detallado por el grupo de Tao (Su y col., 2003). Todos los animales se mantuvieron en el animalario en condiciones de agua y comida *ad libitum*, periodos de luz y oscuridad de 12 horas y temperatura ambiente de 22 °C.

La estabulación y utilización de los animales siguió la normativa vigente de la Unión Europea sobre uso y experimentación con animales de laboratorio (*Council Directive 86/609/EEC*).

1.1.1. Genotipado de ratones 129/ SvJ

Los animales se genotiparon a partir de ADN genómico extraído de la cola del ratón. Las biopsias de la cola se incubaron 10 minutos a 95 °C con 80 µl de tampón de lisis Gitschier modificado 1 X (Tris-HCl 67 mM pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 16,6 mM, MgCl₂ 6,5 mM) con β-mercaptoetanol 1 % y Tritón X-100 0,5 %. Cuando las muestras se hubieron atemperado, se añadieron 5 µl/tubo de proteinasa K (19131, *QIAGEN*) para favorecer la lisis celular. Las muestras se incubaron en un baño a 56 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se inactivó la proteasa a 95 °C durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante que, previa dilución 1:5, se empleó como molde para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación por PCR se llevó a cabo con Taq (*Thermus AQuaticus*) ADN polimerasa (201203, *QIAGEN*) siguiendo el protocolo: 2 minutos 94 °C; 30 ciclos 20 segundos 94 °C, 20 segundos 55 °C, 40 segundos 72 °C; una incubación final

de 5 minutos a 72 °C. Finalmente, los productos de la PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa. Para amplificar los fragmentos correspondientes al genotipo WT (339 bp) y KO (285 bp) se utilizaron las parejas de *primers* AB y BC respectivamente:

- **Primer A** (específico del alelo silvestre)

5'- GCCCCCTGTAAAGTGCAGAC-3'

- **Primer B** (común para el alelo silvestre y el alelo recombinante)

5'- CGCCCCAGTTAGTTAGTCAG-3'

- **Primer C** (específico del alelo mutante)

5'- GCCTGAAGAACGAGATCAGC-3'

1.2. Anticuerpos empleados en el estudio

Para el desarrollo de este trabajo se han empleado anticuerpos policlonales generados por *Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, Reino Unido)* purificados y caracterizados en el laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Cajal (tabla 1). La selección de las secuencias peptídicas antigénicas para la producción de nuestros anticuerpos se hizo teniendo en cuenta que no presentaban homología de aminoácidos consecutivos con otras secuencias de proteínas conocidas (*EMBL, GenBank, and SwissProt*). Los péptidos incluían una cisteína en su extremo N-terminal para su acoplamiento a la proteína transportadora hemocianina vía MBS (m-malimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster). Los antígenos se inyectaron en conejos variedad albina, raza *New Zealand* para la obtención de los antisueros, que se purificaron por afinidad usando el péptido acoplado a *NHS-activated sepharose 4 Fast Flow (17-0906-01, GE Healthcare)*. Para los ensayos de inmunoprecipitación los anticuerpos se marcaron con biotina (*21217, Pierce*).

La selectividad de los anticuerpos generados se comprobó mediante inmunodetección (*Western Blot o WB*) utilizando las proteínas recombinantes sintetizadas para el estudio, a las que previamente se había cortado el *tag* de glutatión S-transferasa

(GST) mediante la proteasa TEV (apartado 2.7.6 de métodos, página 79). En la figura 11 se muestra la detección de las proteínas recombinantes correspondientes a Gai2, Gaz, HINT1 y RGSZ2 con los anticuerpos generados.

Proteína	Nº Acceso NCBI	Epítipo	Aplicación
MOR1	AAB60673	LENLEAETAPLP Aa 387-398, Ct	WB (1:3000)
MOR1	AAB60673	TKYRQGSID Aa 208-216, 2EL	IP (biotinado)
NR1	NP_032195.1	KFGTQERVNNSNKK Aa 482-496, Nt	IP (biotinado)
CB1R	NP_031752	DFHVFHRKDSPN Aa 177-188, 1EL	IP (biotinado) WB (1:1000) IF (1:500)
CB1R	NP_031752	FRGSPFQEKMTAGD Aa 53-66, Nt	IP (biotinado) WB (1:3000), IF (1:500)
HINT1	NP_032274.1	GYRMVVNEGADGGG Aa 93-106	IP (biotinado) WB (1:5000)
RGSZ2	AAF05758	NSQIYKAFVESTTS Aa 192-215	IP (biotinado) WB (1:5000)
Gai2	NP_032164	EEQGMLPEDLS Aa 115-125	IP (biotinado) WB (1:2000)
Gaz	NP_03441	TGPAESKGEITPELL Aa 111-125	IP (biotinado) WB (1:2000)

Tabla 1. Secuencias de los péptidos utilizados para generar los anticuerpos de interés, junto con los números de acceso NCBI de las proteínas correspondientes y la aplicación y dilución de trabajo de cada anticuerpo. EL: bucle extracelular; Nt: extremo amino terminal; Ct: extremo carboxilo terminal; IP: inmunoprecipitación; WB: *western-blot*; IF: inmunofluorescencia.

La especificidad de los anticuerpos producidos también se comprobó mediante su pre-absorción con el péptido antigénico correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente antes de probarlos frente a las proteínas recombinantes producidas. Los anticuerpos generados frente a distintas secuencias de los receptores MOR, CB1R y NMDAR han sido caracterizados previamente en el laboratorio (Garzón y col., 2005d; Garzón y col., 2009; Rodríguez-Muñoz y col., 2012).

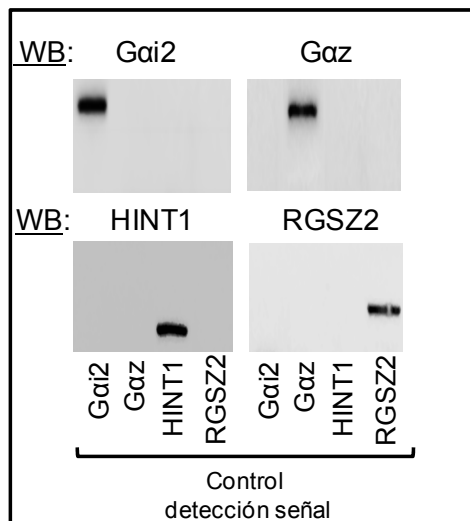


Figura 11. Inmunodetección de las proteínas recombinantes Gai2, Gaz, HINT1 y RGSZ2. Tras el corte del tag de GST con TEV, las proteínas recombinantes se separaron por SDS-PAGE (*SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) y se detectaron con los anticuerpos correspondientes generados en el laboratorio.

También se emplearon anticuerpos comerciales: anti-MOR1C (*RA20001, Neuromics*); anti-CB1R C-terminal (*10006590, Cayman*); anti-NMDAR1 a/b/c/d (*ab6485, Abcam*); anti-NMDAR1 e/f/g/h (*ab6486, Abcam*); anti-NMDAR1 (*ab1880, Abcam*); anti-fosfo-NR1 (Ser896) (*ABN88, Millipore*); anti-fosfo-NR1 (Ser897) (*ABN99, Millipore*); anti-fosfo-NMDAR1 (Ser890) (*#3381S, Cell Signaling*); anti-HINT1 (*H00003094-A01, Abnova*); anti-GST (91G1) (*#2625, Cell Signaling*); anti-PSD-95 (*ab18258, Abcam*); anti-fosfo-NR2A (Tyr1325) (*ab16646, Abcam*); anti-fosfo-CaMKII (Thr286) (*#3361S, Cell Signaling*); anti- β -arrestina 2 (*ab31294, Abcam*); anti-GRK 2 (c-15) (*sc-562, Santa Cruz Biotechnology*); anti- α -actina (*#CSA-400, Stressgen*).

Como anticuerpos secundarios se utilizaron: anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina para detección colorimétrica (IgGs anti-conejo, *#3731, Promega*; IgGs anti-ratón, *#3721, Promega*), anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano para la detección por quimioluminiscencia (reactivo frente a cadenas ligeras Kappa de IgGs de conejo: anti-conejo, *MAB201P, Chemicon*; reactivos frente a las cadenas pesadas y ligeras de IgGs de

conejo, ratón o cabra: anti-conejo, #7074, *Cell Signaling*; anti-ratón, #7076, *Cell Signaling*; anti-cabra, V805A, *Promega*), y anticuerpos frente a las cadenas pesadas y ligeras de IgGs de conejo conjugados con el fluoróforo Alexa-488 para análisis por inmunofluorescencia (A11008, *Invitrogen*).

1.3. Drogas y fármacos

- Agonistas opioides Mu: Morfina sulfato (*Merck, Darmstadt, Alemania*) se preparó en suero salino.
- Agonistas cannabinoides: WIN55.212-2 mesilato (1038, *Tocris*) se disolvió en una mezcla 1:1:18 (v/v/v) de etanol: Cremophor EL (*Sigma Chemical Co. Madrid*): suero salino.
- Antagonistas de NMDAR: MK-801 (#0924, *Tocris*), se preparó en suero salino.
- Inhibidores de PKC: Gö7874 (#365252, *Calbiochem*), se disolvió en DMSO (5 %).

1.4. Diseño y síntesis de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs)

Con el fin de analizar el papel de la proteína RGSZ2 en la analgesia y tolerancia inducidas por el agonista cannabinoide WIN55.212-2, se administraron *in vivo* ODNs antisentido dirigidos frente al ARNm que codifica para esta proteína (NM_019958); de esta forma, se redujo la expresión de la proteína RGSZ2. Los ODNs utilizados en nuestro estudio fueron sintetizados por *Sigma-Genosys Ltd (Cambridge, Reino Unido)*. Las secuencias no mostraron homología con otras proteínas clonadas en esta especie (*Genebank database*).

Los extremos de los ODNs se protegieron con grupos fosforotioato (*) para evitar su degradación por la acción de las exonucleasas. Las secuencias de los dos ODNs sintetizados son las siguientes: ODN1: 5'-T*T*TGTGACTGCTGCCG*T*T-3', correspondiente a los nucleótidos 148-165; ODN2: 5'-C*C*GAAGAGTCTCCTC*T*T*-3' correspondiente a los nucleótidos 281-297. Como control para evaluar los posibles efectos tóxicos y/o variaciones de la analgesia producidas por la utilización de nucleótidos sulfotioados se administró un ODN con una secuencia aleatoria de nucleótidos o *random* (ODN-RD) 5'-C*C*CTTATTACACTTTC*G*C-3' (Gillardon y col., 1994; Sánchez-

Blázquez y col., 1995). También se diseñaron “ODN mismatched” en los que se habían sustituido cinco bases del oligo específico con el fin de evitar que hibridase con el ARNm de la proteína: ODN1-RGSZ2M: 5'-T^{*}T^{*}AGTCAGTGCAGCGG^{*}T^{*}T-3'; ODN2-RGSZ2M: 5'-C^{*}G^{*}GAACAGACTCGTC^{*}A^{*}T-3'.

Proteína	Nº Acceso NCBI	Primers	Vector
CB1R _{CT}	NM_007726.3	5'-ATATGCGAT/CGCCAGGAGCAAGGACCTGAGACATGCTTTC-3' 5'-TTGTGTTT/AAACCAGAGCCTCGGCAGACGTGT-3'	pFN2A
HINT1	NM_008248.2	5'-GGCTGCGAT/CGCCGCTGACGAGATTGCCAAG-3' 5'-GTCGGTTT/AAACCAGGAGGCCAGTTCATCT-3'	pFN2A
NR1 C0/C1/C2 _{CT}	NM_008169	5'-TAAAGCGAT/CGCCGGGATCTTCCTCATT-3' 5'-GTCGGTTT/AAACTCAGCTCTCCCTATG-3'	pFN2A
NR1 C0/C2 _{CT}	NM_008169	5'-TAAAGCGAT/CGCCGGGATCTTCCTCATT-3' 5'-GTCGGTTT/AAACTCAGCTCTCCCTATG-3'	pFN2A
Gaz	NM_010311.3	5'-CACCCGGCAAAGCTCAGA-3' 5'-TCAGCAAAGGCCGATGTACTT-3'	pET151D/TOPO
RGSZ2	NM_019958.4	5'-GACCGCGAT/CGCCAGAAAACGGCAGCAGTCACA-3' 5'-GATGGTTT/AAACTTAGGATTCAGAAGTACAGCTGGTG-3'	pFN2A
MOR1 _{CT}	AF400247.1	5'-AGGAGCGAT/CGCCGCTGTATTATTGTCTGCTGGACC-3' 5'-GCGAGTTT/AAACGGGCAATGGAGCAGTTTCTGCTT-3'	pFN2A
MOR1C _{CT}	AF062753.1	5'-GACCGCGAT/CGCCTTCCTGGATGAAAACCTTC-3' 5'-GTCGGTTT/AAACCCTGCCAAGCTGGCCTTCCCC-3'	pFN2A

Tabla 2. Primers empleados en la amplificación de secuencias para la producción de proteínas recombinantes. A la izquierda aparece la proteína o fragmento de la proteína a producir con el número de acceso de su ARNm correspondiente, en la parte central los *primers* empleados, indicando en primer lugar el *primer* sentido y después el antisentido. Las secuencias subrayadas se corresponden con las dianas de restricción y el símbolo / indica el sitio de corte de las endonucleasas. Finalmente, se indica el vector utilizado para la clonación del inserto y posterior expresión en *Escherichia coli*.

1.5. Diseño y síntesis de cebadores o *primers*

Se diseñaron *primers* tanto para la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* mediante la clonación en el vector PFN2a (GST) Flexi® Vector (C8461, Promega) y pET151/D-TOPO (con un *tag* de seis histidinas) (K151-01, Invitrogen), como

para la expresión en células de mamífero CHO utilizando los vectores pBiFC-VN173 y pBiFC-VC155 (gentilmente cedidos por el Dr. Chang-Deng Hu, *Purdue University*). Para asegurar la calidad de los *primers* diseñados se utilizó un programa informático (*Lasergene, DNASTar*) que analiza la probabilidad de que formen horquillas y dímeros que puedan interferir en la amplificación del producto deseado y determina su temperatura óptima de hibridación, así como otros parámetros importantes para optimizar las condiciones de la PCR. Los *primers* empleados para la producción de proteínas recombinantes y para BiFC se muestran respectivamente en las tablas 2 y 3.

Proteína	Nº Acceso NCBI	Primers	Vector
HINT1	NM_008248.2	5'- <u>G</u> /AATTCCGCGAGGGCTGACGA-3' 5'-G/ <u>TCGAC</u> CAACCTGCTTTTACC-3'	pBiFC-VN173
HINT	NM_008248.2	5'- <u>G</u> /AATTCCGAGGGCTGACGA-3' 5'- <u>C</u> /TCGAGCCAACCTGCTTTTACC-3'	pBiFC-VC155
RGSZ2	NM_019958.4	5'-ATTCG/AATTCCATGAGAAAACGGCAGCAG-3' 5'-ATCGG/ <u>TCGAC</u> TCAGAAGTACAGCTGGTGG-3'	pBiFC-VN173
RGSZ2	NM_019958.4	5'-ATTCG/AATTCCGGATGAGAAAACGGCAGCAG-3' 5'-ATCGG/ <u>GTAC</u> CTCAGAAGTACAGCTGGTGG-3'	pBiFC-VC155
CB1R	NM_007726.3	5'-TATTG/AATTCCGCGTTATGAAGTCGATCTTAGACGGC-3' 5'-AACTG/ <u>GTACC</u> AGCCTCGGCAGACGTGTC-3'	pBiFC-VC155
NR1 C0/C1/C2	NM_008169	5'-AGGA/ <u>AGCT</u> TAGACCATGCACCTGCTGACATTC-3' 5'-CGT/ <u>CTAGAG</u> CGTCTCTGCTCTCCCTATGAC-3'	pBiFC-VN173
MOR1	AF400247.1	5'-CCGG/ <u>TCGAC</u> GCAAGCATTGAGAACCAAGGACA-3' 5'-GGTAC/ <u>CGGAT</u> GGCGTGGGACCCAGTTTG-3'	pBiFC-VC155
MOR1	AF400247.1	5'-CCGGC/ <u>GGCCG</u> GCAAGCATTGAGAACCAAGGACA-3' 5'-GAGA/ <u>GATCT</u> GATGGCGTGGGACCCAGTTTG-3'	pBiFC-VN173

Tabla 3. Primers empleados en la amplificación de secuencias para ensayos BiFC. A la izquierda aparece la proteína a producir con el número de acceso de su ARNm correspondiente, en la parte central los *primers* empleados, indicando en primer lugar el *primer* sentido y después el antisentido. Las secuencias subrayadas se corresponden con los dianas de restricción y el símbolo / indica el sitio de corte de las endonucleasas. Finalmente, se indica el vector utilizado para la clonación del inserto y posterior expresión en células CHO.

1.6. Cultivos celulares

1.6.1. Cultivo primario enriquecido en astrocitos corticales tipo I

Los cultivos primarios enriquecidos en astrocitos se prepararon a partir de cortezas cerebrales de ratas Wistar postnatales de 0 hasta 3 días de edad.

Las cabezas de los neonatos se decapitaron para la extracción de los cerebros. Trabajando siempre en condiciones estériles, se separaron las meninges de los hemisferios cerebrales con la ayuda de una lupa binocular. Las cortezas libres de meninges se lavaron con HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution, 14175-137, Invitrogen*) frío sin calcio ni magnesio y se trocearon con unas tijeras estériles. Para favorecer la disgregación del tejido, se incubó en un baño a 37 °C durante 25 minutos en solución salina balanceada. A continuación, el tejido se disgregó mecánicamente con una pipeta de 1 ml hasta conseguir una suspensión homogénea, que se centrifugó 5 minutos a 1.000 rpm. Tras descartar el sobrenadante con una pipeta Pasteur, se resuspendió el sedimento en 600 µl de medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, 41966-029, Invitrogen*) al que previamente se había añadido un 10 % de suero fetal bovino (*10270-106, Gibco*) y penicilina/estreptomicina al 1 % (*15140-122, Invitrogen*). Este homogeneizado se pasó a través de un filtro de 40 µm, separándose así vasos sanguíneos y agregados celulares que interfieren en la obtención de un cultivo puro. La suspensión celular de corteza se sembró en frascos de cultivo de 75 cm². Las células se mantuvieron durante 12 días en un incubador a 37° C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %, cambiando el medio cada 3 días.

La multiplicación de los astrocitos se inhibe cuando establecen contacto entre sí, lo que permite la formación de una monocapa confluyente a los 8-10 días en la que cada célula se adhiere a la superficie de crecimiento y contacta con las células vecinas de alrededor. Los astrocitos se purifican según la capacidad de adhesión de las células a esta superficie. Así, mediante agitación orbital durante toda la noche a 280 rpm y 37 °C se

minimizó la contaminación existente por microglía y oligodendrocitos, menos adheridos a la superficie que los astrocitos.

Para desprender los astrocitos de la superficie de los frascos de cultivo, se utilizó una solución de tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,05 % (15400-054, *Invitrogen*). Seguidamente, se neutralizó la tripsina añadiendo DMEM con un 10 % de suero fetal bovino para evitar daños celulares. La suspensión se centrifugó 5 min a 1.000 rpm y el pellet obtenido se resuspendió en DMEM más 10 % de suero. Tras contar el número de células en el hemocitómetro (cámara de Neubauer), se sembraron en cubres de 10 mm recubiertos con poli-D-lisina 10 µg/ml a una densidad de 20.000 células por cubre. Los cultivos se mantuvieron 6 horas en DMEM con 10 % de suero fetal bovino y, transcurrido este tiempo, se redujo la concentración del suero al 1 %.

1.6.2. Mantenimiento de línea celular CHO

Las células CHO se cultivaron en medio suplementado con Glutamax®-I, D-glucosa 4,5 g/l, piruvato sódico 110 mg/l, suero fetal bovino 10 %, penicilina 100 U/ml y estreptomycin-sulfato 100 µg/ml, a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂.

Cuando las células alcanzaron un 70-80 % de confluencia, se trataron durante 5 min a 37 °C con una solución de tripsina-EDTA al 0,05 % (15400-054, *Invitrogen*), previamente precalentada, para desprenderlas de la superficie del frasco de cultivo; una vez sueltas, se lavaron con 5 ml de medio DMEM-F12 (31331-028, *Invitrogen*) con 10 % de suero fetal bovino para inactivar la tripsina. Se transfirió la suspensión celular a tubos estériles de fondo cónico y se centrifugó 5 minutos a 1.000 rpm. El pellet celular se resuspendió en medio DMEM-F12 sin suero hasta conseguir una suspensión homogénea. Tras contar y determinar la viabilidad celular con azul Trypan, se sembraron $1,3-1,5 \times 10^5$ células/pocillo en placas de 8 pocillos con fondo de vidrio (155411, *Lab-Tek™ Chambered Coverglass, Nunc*).

2. Métodos

2.1. Estudio de la actividad motora espontánea: test del campo abierto

El estudio de la actividad espontánea se llevó a cabo en cámaras automáticas *VersaMax* (*AccuScan Instruments Inc.*) de 42x42x30 cm (largo x ancho x alto), colocadas en el interior de un marco dotado de células fotoeléctricas; la interrupción de los haces de luz de cada cámara se monitorizó y analizó con el software *VersaMax* y *VersaDat* (*AccuScan Instruments Inc.*). Todos los estudios se hicieron entre 9:00 y 14:00 h, en una habitación con iluminación tenue (aproximadamente 80 lux), provista de un ventilador para el control de la temperatura y el enmascaramiento del ruido de fondo.

Las cámaras se dividieron en 4 cuadrantes por dos láminas transparentes dispuestas en cruz, de manera que se formara un ángulo de 90° entre ambas. En cada experimento se introdujeron dos ratones por cámara, uno en el cuadrante inferior izquierdo y otro en el superior derecho, y se registró su actividad locomotora espontánea durante 90 minutos. Al final del experimento, los animales se colocaron de nuevo en sus respectivas cajas. Para minimizar la influencia de la ansiedad en la actividad locomotora espontánea, los ratones se manipularon y pre-expusieron a las cámaras antes del comienzo de cada experimento. Los parámetros analizados fueron: el número de movimientos, la distancia recorrida (en centímetros), la actividad horizontal, la actividad vertical, el tiempo en el centro (en segundos) y la velocidad (en centímetros/segundo); siendo el tiempo en el centro un indicador de ansiedad.

2.2. Administración intracerebroventricular

Con el fin de asegurar la introducción de los diferentes compuestos a nivel del SNC se administraron vía icv. Los ratones se anestesiaron ligeramente con isoflurano 1,5% (*Isoba®Vet*, *Schering-Plough*, *Middlesex*, *Reino Unido*) (en 70% N₂O, 30% O₂) y después se aplicó la inyección con una jeringa Hamilton de 10 µl en el ventrículo lateral derecho en un punto que dista 2 mm hacia la zona caudal y 2 mm hacia la zona lateral de

la bregma, a una profundidad de 3 mm. Todas las administraciones se realizaron en un volumen de 4 µl de solución, que fue infundida a una velocidad de 1 µl cada 5 segundos.

2.2.1. Administración icv de oligodeoxinucleótidos antisentido

La administración *in vivo* de ODNs ha demostrado ser eficaz en reducir la expresión de determinadas proteínas, favoreciendo la degradación del ARNm o interfiriendo con la maquinaria de traducción. Los ODNs han de ser estables *in vivo*, capaces de penetrar en la célula diana, deben ser retenidos por estas células e interaccionar con sus dianas celulares de forma específica (Stein y Cheng, 1993).

Se administraron de forma subcrónica en el ventrículo lateral vía icv. Cada animal recibió una serie de inyecciones de ODNs siguiendo un protocolo de 5 días: los días 1 y 2, 1 nmol, los días 3 y 4, 2 nmoles, y el día 5, 3 nmoles. Los estudios funcionales se comenzaron en el día 6.

2.3. Medida del efecto analgésico: test de retirada de la cola

La respuesta de los animales al estímulo nociceptivo se determinó con el test de la retirada de la cola que consiste en la aplicación de un estímulo de tipo térmico en la cola del animal, para lo cual se introducen más de dos tercios de la misma en una cubeta con agua termostatzada a 52 °C (Nott, 1968). La evaluación de la respuesta al dolor se realiza midiendo el tiempo (en segundos) que transcurre hasta que el animal reacciona al estímulo doloroso con un enérgico coletazo o sacudida corporal.

Las diferentes dosis de los analgésicos morfina y WIN55.212-2 se administraron por vía icv precedidas o no por una dosis de 1 nmol del antagonista del NMDAR, MK-801, o del inhibidor de PKC, Gö7874. Los tiempos de latencia se evaluaron antes (latencia basal) y a diferentes intervalos después de la administración del agonista (latencia del test). Las latencias basales no se vieron afectadas significativamente por el solvente utilizado para el agonista cannabinoide, etanol /Cremophor EL (Sigma Chemical Co., Madrid)/ solución salina (1:1:18). Con el fin de no producir daño tisular al animal, se

estableció un tiempo de corte de 10 segundos. Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (ESM) del porcentaje del efecto analgésico máximo (% EAM), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% EAM = \frac{100 \times (\text{latencia del test} - \text{latencia basal})}{(10 - \text{latencia basal})}$$

La significación estadística se determinó por el análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$.

2.4. Desarrollo de tolerancia aguda en el ratón

Los analgésicos producen tolerancia con dosis agudas capaces de alcanzar el 70-80 % del EAM. Consecuentemente, los animales recibieron vía icv una dosis de morfina (10 nmol/ratón) o WIN55.212-2 (20 nmol/ratón o 6-4 nmol/ratón en ratones KO y WT para HINT1). Pasadas 24 horas, cuando el efecto analgésico de la primera dosis había cesado y la respuesta de latencia basal era similar a la inicial, se administró una segunda dosis del agonista. El grupo control recibió en lugar de la primera dosis de agonista un volumen similar de solución salina. Para medir el efecto analgésico se utilizó el test de retirada de la cola como se ha detallado anteriormente. Se evaluó el desarrollo de tolerancia a WIN55.212-2 o morfina en el pico de efecto, a los 10 y 30 minutos respectivamente, después de la segunda administración. La significación estadística se determinó con un análisis de la varianza seguido de un test de t de Student. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$.

Otros grupos de ratones a los que se había inyectado morfina o WIN55.212-2 se emplearon para estudiar los cambios producidos a nivel molecular tras la administración de estos compuestos. Estos animales se sacrificaron por decapitación a los intervalos deseados y se extrajeron las estructuras cerebrales para su estudio. Las muestras de tejido se prepararon para su posterior procesamiento por inmunoprecipitación.

2.5. Ensayos de inmunoprecipitación

2.5.1. Obtención y preparación de las muestras

Grupos de 6-8 ratones se sacrificaron por decapitación para la extracción en frío de sus estructuras cerebrales. El proceso se realizó a 4 °C, empleándose un tampón Tris-HCl 25 mM pH 7,5, sacarosa 0,32 M, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,25 mM, una mezcla de inhibidores de proteasas (*P8340, Sigma*) y una mezcla de inhibidores de fosfatasas (*P2850, Sigma*). El tejido resuspendido en tampón se disgregó con un homogeneizador *Polytron (PT10/35 Kinematica, Kriens-Luzern, Switzerland)* durante 15 segundos en el punto 3 de potencia.

A continuación, se procedió a separar los componentes celulares del tejido solubilizado en función de su tamaño y su densidad. Centrifugando a 1.000 xg (*Sorvall RCSC, rotor SS34, Newton, CT, USA*) durante 10 minutos, sedimentaron los componentes de mayor tamaño, como los núcleos y las células enteras formando un precipitado en el fondo del tubo de centrifuga (P1). En el sobrenadante (S1) quedaron pequeños fragmentos de las membranas sinápticas recircularizados en forma de vesículas. El S1 se sometió a una segunda centrifugación de 20 minutos a 20.000 xg para obtener la fracción rica en sinaptosomas (P2). Posteriormente, se procedió a eliminar muchos de sus contaminantes, resuspendiendo de nuevo el precipitado P2 y repitiendo el procedimiento de centrifugación. El sedimento final se resuspendió en tampón Tris-HCl 25 mM pH 7,5 PMSF 10 µM a una concentración de proteína de 3-5 µg/µl (*Bio-Rad Protein Assay, 500-0006, Bio-Rad*) y se guardó a -80°C hasta el momento de ser utilizado. También se determinó la concentración proteica del sobrenadante (S2), que constituye la fracción citosólica, y se congeló a -20 °C hasta su empleo.

2.5.2. Inmunoprecipitación de proteínas

Las proteínas procedentes de la fracción de membranas P2 o de la fracción citosólica S2, se solubilizaron en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, Nonidet NP-40 1 %

(detergente no iónico), con una mezcla de inhibidores de proteasas (*P8340, Sigma*) y una mezcla de inhibidores de fosfatasas (*cocktail 1, P2850 Sigma; cocktail 2; P5726 Sigma*). Este solubilizado se sometió a 2 ciclos de sonicación de 10 segundos y se dejó en agitación a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 10.000 xg para eliminar el tejido no solubilizado.

Con el fin de evitar uniones inespecíficas entre la estreptavidina agarosa y las proteínas presentes en la muestra se realizó un aclarado preliminar durante 1 hora a 4 °C con 30 µl de estreptavidina agarosa (*#17-5113-01 Amersham Biosciences*). Posteriormente, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 5.000 xg. Los sobrenadantes obtenidos se incubaron, en agitación moderada, 18 horas a 4 °C en presencia de inmunoglobulinas G (IgGs) biotinadas dirigidas frente a las proteínas de interés.

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo, las muestras se incubaron con estreptavidina agarosa (20 µl por cada 200 µg de proteína) durante 2 horas, posteriormente se centrifugaron a 5.000 xg y se retiraron los sobrenadantes. Los pellets formados por la agarosa que llevaban unida la proteína de interés se sometieron a 4 ciclos de lavado de 15 minutos en 1 ml del tampón anterior seguido de centrifugación para eliminar el material unido de forma inespecífica.

Los complejos antígeno-anticuerpo obtenidos por precipitación con estreptavidina agarosa se solubilizaron en un tampón Tris-HCl 40 mM pH 7,5, dodecilsulfato de sodio (SDS) 1 % y se calentaron 10 minutos a 100 °C para disociar lo unido a las IgGs del complejo IgG-biotina-estreptavidina-agarosa. El material se enfrió y se filtró por centrifugación en filtros de 0,22 µm (*Ultrafree-MC UFC30GV Millipore*). Con el fin de evitar que la inmunodetección posterior se pudiese ver interferida por la presencia de IgGs biotinadas que se hubiesen liberado durante la solubilización y posterior calentamiento de las muestras, se añadieron 30 µl de estreptavidina agarosa y el mismo volumen de un tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM y octiltiogluco sido 0,65 %. El octiltiogluco sido ayuda a eliminar el SDS de las proteínas y favorece la interacción de la estreptavidina agarosa con la biotina. La mezcla se incubó 4 horas en agitación a 4 °C, tras

las cuales se centrifugó a 10.000 xg para eliminar la agarosa junto con las IgGs biotinadas. El sobrenadante, que contenía las proteínas de interés, se concentró con el sistema *Ultrafree-MC 10.000 NMWL (Amicon Microcon YM-10, #42407, Millipore)* que retiene las proteínas de peso molecular superior a 10 KDa y se solubilizó para su análisis por SDS-PAGE (*SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*).

2.6. Electroforesis de proteínas y transferencia a soporte sólido: detección inmunológica (*western blot*).

Las muestras se solubilizaron en tampón de carga Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 25 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,01 % (*Laemmli Sample Buffer, #161-0737, Bio-Rad*) con β -mercaptoetanol 5 % en proporción 1:1 (v/v), y se calentaron a 100 °C durante 10 minutos. La combinación de un detergente aniónico como el SDS, un agente reductor como el β -mercaptoetanol y calor es fundamental para minimizar la agregación y disociar las proteínas en sus subunidades individuales. Además, el tratamiento conjunto de SDS (rompe uniones no covalentes) más el agente reductor (rompe puentes disulfuro) elimina los efectos de las diferentes conformaciones de las proteínas de manera que la longitud de la cadena, que refleja la masa, es la que determina la velocidad de migración en una SDS-PAGE. De esta forma, las proteínas pequeñas se desplazan rápidamente a través del gel mientras que las grandes permanecen arriba, cerca del punto de aplicación de la muestra, siendo el desplazamiento de la mayoría de las cadenas polipeptídicas, en condiciones ideales, linealmente proporcional al logaritmo de su masa. Esto nos permite estimar el peso molecular de una proteína comparándola con la distancia de migración de un patrón de proteínas de peso molecular conocido (10-250 KDa: *Precision Plus Protein™ All Blue Standards, 161-0373, Bio-Rad*; 3-188 KDa: *SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, LC5925, Invitrogen*). Las separaciones electroforéticas se realizaron sobre matrices eléctricamente neutras que sirven de tamices moleculares que potencian la separación. Utilizamos geles del 7-14 % de acrilamida/bis-acrilamida (*161-0148, Bio-Rad*), de 0,15x12x10 cm, o geles Bis/Tris 4-12 % (*NuPAGE, NP0341, Invitrogen*) para proteínas de bajo peso molecular. Una vez separadas, las proteínas de la mezcla fueron transferidas a partir del gel a membranas de polivinil-difluoruro (PVDF) de 0,2 μ m (*Immun-Blot PVDF*

Membrane, #162-0177, *Bio-Rad*). Tras la transferencia *western*, las membranas se bloquearon con proteínas de leche deshidratada y deslipidada (*Blocker*, 170-6404, *BioRad*) preparadas al 5 % en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 200 mM y Tween-20 0,05 % (TTBS), durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La detección inmunológica de la proteína de interés se hizo de manera indirecta, en dos etapas: en primer lugar, el anticuerpo específico se incubó 12-48 horas a 4 °C en abierto o en cámaras de incubación (*Deca-Probe Incubation Manifold*, *Hoef er-GE Healthcare PR150*) con la membrana donde se encontraban inmovilizadas las proteínas. Seguidamente, se lavó la membrana con TTBS y se procedió a su incubación durante 2 horas con anticuerpo secundario tipo anti-inmunoglobulina preparado a una dilución 1:10.000 en TTBS, acoplado a la enzima fosfatasa alcalina (*Promega*) o a peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase o HRP*, *Cellular Signaling*) para un revelado cromogénico en el primer caso (*S3841*, *Promega*) o por quimioluminiscencia (*ECL Advance[®] Western Blotting Detection Kit*, *RPN2135*, *GE Healthcare*) en el segundo. Las imágenes se visualizaron mediante una cámara CCD empleando un sistema ChemiImager IS-5500 (*Alpha Innotech Corp.*, *San Leandro, California*) y se analizaron por densitometría (*AlphaEase v3.2.2*). Se comprobaron los niveles de α -actina para verificar la igualdad de carga en los geles. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el test del análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$.

2.7. Producción de proteínas recombinantes

2.7.1. Obtención de ADN complementario como molde para PCR

Para la amplificación de las secuencias nucleotídicas deseadas se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction o RT-PCR*). La RT-PCR incluye dos fases, en la primera se retrotranscribe el ARN a su ADNc y en la segunda, usando el ADNc como molde, se amplifica la secuencia que se quiere estudiar mediante PCR.

Como primer paso para la obtención del ADNc, se aisló el ARN de cerebro de ratón utilizando TRIzol® (12183018A, Purelink® RNA Mini Kit, Invitrogen), una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que mantiene la integridad del ARN mientras lisa las células y disuelve los componentes celulares. Posteriormente, la adición de cloroformo seguida por una centrifugación a 12.000 xg durante 15 min a 4 °C separó la solución en dos fases, abajo una fase orgánica y, sobre ésta, una fase acuosa que contenía el ARN. Tras recoger la fase acuosa, se añadió la cantidad suficiente de etanol para conseguir una concentración final del 35 %. Seguidamente, se transfirió la solución a una columna Micro-to Midi® (12183018A, Purelink® RNA Mini Kit, Invitrogen) en la que, mediante lavados sucesivos, se eliminaron los contaminantes unidos al ARN que, finalmente, se eluyó con agua libre de ARNasas. El ARN purificado se cuantificó midiendo su absorbancia a 230 nm con un espectrofotómetro NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific).

Este ARN, previamente tratado con ADNasaI para la eliminación de cualquier posible contaminación por ADN genómico, se empleó para la síntesis de ADNc. En la mezcla de reacción de retrotranscripción se añadieron 5 µg de ARN, cebador oligo (dT18) a una concentración final de 5 µM, tampón con sales (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT 10 mM), mezcla de deoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) a una concentración de 1 mM, 20 unidades de inhibidor de ARNasa y 200 unidades de enzima transcriptasa reversa M-MuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) en un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó 1 hora en un termobloque a 42 °C, seguida por 5 minutos a 70 °C para la inactivación de la transcriptasa. Todo este procedimiento se realizó con el kit RevertAid® (K1632, RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas).

2.7.2. Clonaje

Las regiones codificantes de las proteínas empleadas en el desarrollo de este trabajo (CB1R_{CT}, RGSZ2, HINT1, NR1 C0/C1/C2_{CT}, NR1 C0/C2_{CT}, Gα_z, MOR1_{CT}, MOR1C_{CT}) se amplificaron mediante PCR en un termociclador DNA Mastercycler (950000031,

Eppendorf) con ADN polimerasas recombinantes de alta fidelidad. Para la amplificación de la secuencia correspondiente al extremo carboxilo del receptor cannabinoide tipo 1 se empleó la ADN polimerasa *Platinum Pfx* (11708013, *Invitrogen*); en el caso de la Gaz se utilizó la ADN polimerasa *Accuprime Pfx* (12344-024, *Invitrogen*); en el resto de los casos, se empleó una mezcla de polimerasas compuesta por Taq ADN polimerasa y una polimerasa termoestable con actividad exonucleasa 3'→5' (K0191, *High Fidelity PCR Enzyme Mix*, *Fermentas*). Los *primers* empleados para la amplificación de las secuencias se muestran en la tabla 2 del apartado materiales (página 62).

Los fragmentos de ADN amplificado se analizaron por electroforesis en gel de agarosa en tampón TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM); utilizando un marcador de ADN de 1 Kb (*SM1143, O'Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas*) o 5 Kb (*SM1563, O'GeneRuler™ Express DNA Ladder, ready-to-use, Fermentas*) para comprobar que aparecían a la altura esperada. Una vez hecho esto, se purificó el fragmento amplificado de interés del gel de agarosa con el sistema de extracción *Purelink® Quick Gel Extraction kit* (K2100-12, *Invitrogen*), basado en la adsorción y desorción de ácidos nucleicos por una membrana de sílica en presencia de sales caotrópicas. En todos los casos, excepto en el de la Gaz, el ADN purificado se digirió simultáneamente con las enzimas de restricción SgfI y PmeI durante 2 horas a 37 °C. Pasado este tiempo, se purificó el producto de la digestión por cromatografía de adsorción con el *kit Purelink® PCR Purification* (K3100-02, *Invitrogen*) y se cuantificó con el espectrofotómetro *Nanodrop® 1000* (*Thermo Scientific*). En el caso de la Gaz, la secuencia de ADN amplificada y purificada se ligó directamente con el vector sin necesidad de ser cortada por endonucleasas.

Para la expresión en *E. coli* se eligieron los vectores pFN2A (C8461, *Flexi® Vector System, Promega*) y pET151/D-TOPO (K151-01, *Invitrogen*), este último para la expresión de la proteína Gaz (Figura 12). El clon de la Gai2 se compró a *GeneCopoeia* (EX-Mm02765-B03); el ADNc de la Gai2 (NM_008138.3) estaba insertado en un vector de expresión pReceiver-B03 que contenía un *tag* de GST en el extremo N-terminal de la

región codificante y un sitio de corte para la proteasa TEV para la eliminación del *tag* tras la purificación de la proteína.

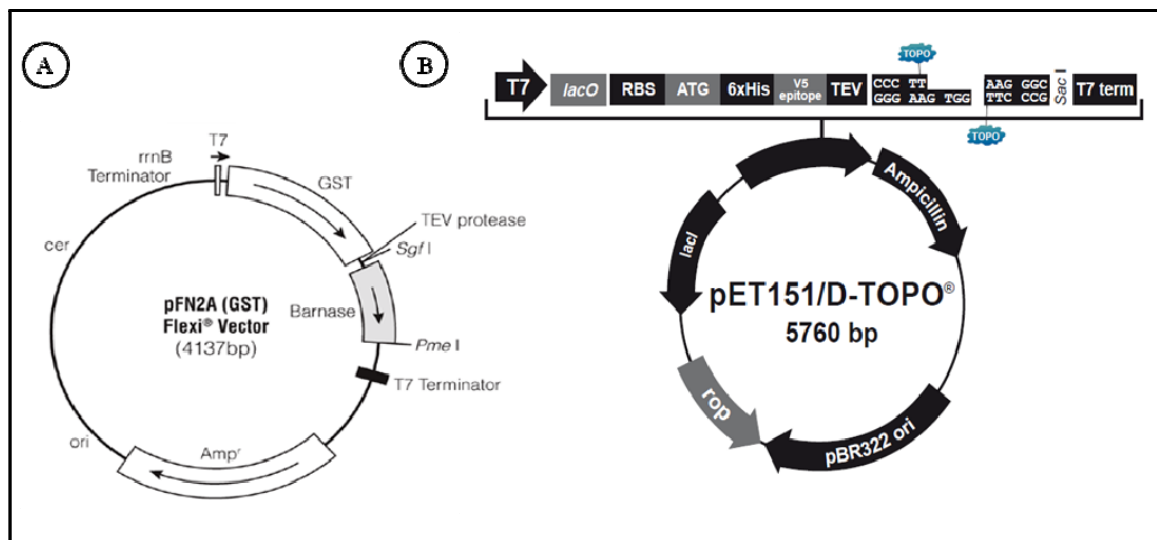


Figura 12. Vectores empleados para la expresión de nuestras proteínas recombinantes. (A) vector pFN2A: en este vector, las dianas de restricción de las enzimas *SgfI* y *PmeI* están flanqueando la secuencia codificante para barnasa, que de no ser sustituida por el inserto deseado resulta letal para la bacteria; de esta forma, se aumenta la eficiencia de la transformación. Por otro lado, las enzimas *SgfI* y *PmeI* generan extremos cohesivos y romos respectivamente, asegurando la correcta orientación del inserto. **(B) vector pET151/D-TOPO:** es un vector linearizado de expresión que contiene en su extremo 3' una cola de cuatro nucleótidos (GTGG) que solapa con la cola de 4 nucleótidos (CACC) que se introduce en el *primer* sentido para la clonación de la proteína recombinante, asegurando así la introducción en el vector de la secuencia de interés en la orientación correcta.

Con el fin de insertar el fragmento de ADN amplificado en el vector pFN2A, se linearizó el vector (500 ng) con *SgfI* y *PmeI* y se purificó con el kit *Purelink® PCR Purification* (K3100-02, *Invitrogen*). A continuación, el inserto y el vector linearizado, ambos digeridos con las mismas enzimas de restricción (*SgfI* y *PmeI*), se unieron por sus extremos complementarios tras una incubación durante toda la noche a 4 °C en presencia de T4 ADN ligasa (*EL0011*, *Fermentas*). El vector pET151/D-TOPO se ligó con la secuencia de ADN amplificada y purificada de *Gaz* durante 5 minutos a temperatura ambiente, sin necesidad de utilizar ligasas. Para establecer la cantidad de inserto a utilizar en la reacción de ligación, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{masa del inserto (ng)} = \frac{\text{masa del vector (ng)} \times \text{tamaño del inserto (Kb)}}{\text{tamaño del vector (Kb)}} \times I/V$$

donde I/V es la relación molar inserto/vector.

2.7.3. Transformación y análisis de clones

Para la replicación de los plásmidos y posterior expresión de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa bacteriana KRX (*L3002, Single Step KRX Competent Cells, Promega*), derivada de *E.coli* K12. Una alícuota de 50 µl de bacterias KRX se transformó con 5 µl de la mezcla de ligación y se incubó durante 30 minutos en hielo. Pasado este tiempo, las bacterias se sometieron a un choque térmico a 42 °C durante 30 segundos, seguido por una incubación de 2 minutos en hielo. Tras el enfriamiento, se añadió a las bacterias 450 µl de medio de cultivo SOC (extracto de levadura 0,5 %, triptona 2 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) sin antibiótico y se incubaron 1 hora en agitación a 37 °C.

Con el fin de seleccionar las bacterias que habían incorporado el producto de la ligación, se plaquearon las muestras en placas de Petri con agar LB (*Lysogeny Broth*) con ampicilina (100 µg/ml). Al día siguiente, se picaron de 5 a 10 colonias y se crecieron durante toda la noche en medio de cultivo LB-ampicilina (extracto de levadura 0,5 %, triptona 0,1 %, NaCl 10 g/l, ampicilina 100 mg/l) en un agitador a 37 °C y 275 rpm. Tras lo cual, se extrajo el ADN plasmídico de las células bacterianas en suspensión con el kit *QIAprep Spin Miniprep (27104, QIAGEN)*, basado en el procedimiento de lisis alcalina desarrollado por Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979).

Con el objetivo de verificar la presencia del inserto en los constructos obtenidos, se digirió enzimáticamente el ADN plasmídico obtenido con las enzimas utilizadas para introducir el gen de interés en el vector y con otras combinaciones de enzimas para comprobar la correcta orientación del inserto. Finalmente, se secuenciaron los constructos obtenidos para descartar la presencia de mutaciones en la secuencia y confirmar que nuestro gen se había insertado respetando el marco de lectura. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en las instalaciones de Secugen S.L. en el Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, España).

2.7.4. Expresión

La cepa bacteriana KRX tiene incorporado en su cromosoma una copia del gen de la T7 ARN polimerasa, bajo el control del promotor de ramnosa (RhaPBAD). Este promotor está sujeto a represión catabólica por glucosa y se activa añadiendo ramnosa al medio, proporcionando un control preciso de la producción de T7 ARN polimerasa y, por tanto, de la expresión de la proteína recombinante.

Para la expresión de las proteínas utilizadas en este trabajo, se inocularon 10 ml de medio LB-ampicilina-glucosa (ampicilina 100 mg/l y glucosa 0,4 %) con la colonia de bacterias seleccionada por análisis de restricción y secuenciación. El cultivo se incubó en un agitador a 37 °C y 275 rpm durante la noche. A la mañana siguiente, se diluyó el inóculo en un litro de LB-ampicilina y se volvió a introducir en el agitador en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4-0,5. Posteriormente, el cultivo se trasladó a un agitador a 25 °C y 275 rpm hasta que las bacterias se encontraron a una densidad óptica de 0,5-0,6. En ese momento se indujo la expresión de la proteína con la adición de ramnosa 0,1 %, más isopropil β -D-tiogalactósido (IPTG) 1 mM en el caso de G α z, ya que el vector TOPO contiene un operón *lac* para reducir la expresión basal de la proteína recombinante. Tras una incubación de 4 horas a 25 °C y 275 rpm, se centrifugaron las bacterias a 8.000 rpm durante 15 minutos y los pellets obtenidos se congelaron a -80 °C.

2.7.5. Purificación

El pellet de bacterias congelado se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón 1 %, Tween 0,05 %, DTT 3 mM, PMSF 1 mM, lisozima 1 mg/ml en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (*P8465*, Sigma-Aldrich). Se mantuvo 15 minutos en hielo y se sonicó. En el caso de NR1 C0/C1/C2_{CT} y CB1R_{CT} se añadió antes de la sonicación 0,375 g del detergente aniónico *Sarkosyl* (*N-lauroylsarcosine sodium salt*) para favorecer la solubilización de la proteína (Frangioni y Neel, 1993). En último lugar, se trató con ADNaseI 10 μ g/ml (DN25, Sigma-Aldrich) en

MgSO₄ 5 mM durante 30 minutos en noria a 4 °C. La proteína NR1 C0/C2_{CT} se extrajo con *BugBuster Master Mix* (71456-3, Novagen) suplementado con PMSF 1 mM y con una mezcla de inhibidores de proteasas (*P8465, Sigma-Aldrich*). Más tarde, la suspensión celular se incubó 20 minutos en un agitador a temperatura ambiente.

Por otro lado, la subunidad Gaz estaba fusionada en su extremo N-terminal con un *tag* de seis histidinas que permitió su purificación mediante cromatografía de afinidad con níquel. Esta proteína se extrajo con *BugBuster Master Mix* (71456-3, Novagen) suplementado con PMSF 1 mM y con una mezcla de inhibidores de proteasas específico de proteínas con *tag* de histidinas (*P8849, Sigma-Aldrich*).

Después de la extracción, los lisados celulares se centrifugaron a 19.000 rpm durante 20 minutos. Se filtró el sobrenadante para eliminar impurezas y las proteínas de fusión recuperadas se purificaron por cromatografía de afinidad mediante columnas de *Glutathion Sepharosa*[®] 4 Fast Flow (17-5130-01, GE Healthcare) o columnas *HisTrap HP*[®] (17-5247-01, GE Healthcare). Lo unido a la columna se eluyó con un gradiente de 0 a 10 mM de glutatión reducido en el caso de proteínas fusionadas a GST, o con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el caso de la proteína Gaz (fusionada a una cola de histidinas). Para terminar, se analizaron las fracciones obtenidas mediante *western blot* y se procesaron aquellas en las que la proteína estaba enriquecida.

En aquellos casos en los que la presencia de la proteína de interés era menor de un 70 % respecto a las proteínas parásitas, se procedió a la purificación de las proteínas recombinantes por electroelución. Las proteínas eluidas se solubilizaron en Tris 25 mM, SDS 1 % y se cargaron en un gel preparativo de acrilamida/bis-acrilamida (161-0148, Bio-Rad) al 11 %. Las bandas correspondientes a las proteínas CB1R_{CT}, NR1 C0/C2_{CT} y Gaz se cortaron del gel tras visualizarlas con tinción de cobre (161-0470, Bio-Rad). Las proteínas se electroeluyeron con un *Electro Eluter Model 422* (165-2976, Bio-Rad). Se redujo la concentración de SDS de la muestra obtenida mediante dilución y concentración (*Ultracel 10000 NMWL UFC901096, Millipore Ibérica S.A.*) y se almacenaron a -20 °C.

2.7.6. Corte proteolítico con la proteasa TEV

La proteasa proTEV (*V6051, Tobacco Etch Virus, Promega*) se utilizó al final del proceso de purificación para cortar el *tag* de GST fusionado a las proteínas recombinantes. Después de la unión de la proteína de fusión a la resina y del lavado de la columna para arrastrar las impurezas unidas junto a la proteína de interés, se equilibró la columna con el tampón HEPES 50 mM pH 7, EDTA 0,5 mM, DTT 1mM, adecuado para el funcionamiento de la enzima. Se introdujeron en la columna 200 unidades de proteasa TEV disuelta en 1 ml del tampón anterior con ayuda de una jeringa de 1 ml. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente haciendo recircular el tampón cada 15 minutos durante 2 horas o a 4 °C en una rueda giratoria durante toda la noche; ya que la enzima permanece activa en un amplio rango de temperaturas, de 4 a 30 °C, aunque su funcionamiento óptimo se alcanza a 30 °C y pH 7. La enzima TEV reconoce una secuencia específica de 7 aminoácidos (ENLYFQG) localizados en el extremo 5' del sitio de clonaje del vector pFN2A. De esta forma, la proteasa corta la secuencia aminoacídica dejando el GST unido a la resina y la proteína de interés en el tampón. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la columna con 10 ml de HEPES 50 mM pH 7, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM que se recogieron junto con el tampón que estaba dentro de la columna. Se concentró la solución hasta aproximadamente 2 ml, a los que se añadieron 45 µl de agarosa-Ni²⁺ (*17-0575-01, Chelating Sepharose Fast-Flow, GE Healthcare*) y 45 µl de glutatión agarosa (*17-0756-01, Glutathion Sepharose 4b, GE Healthcare*). La agarosa-Ni²⁺ se añadió para eliminar la enzima del medio de reacción, pues la proteasa está fusionada a 3 histidinas combinadas con 3 glutaminas en su extremo amino terminal. La glutatión agarosa se incluyó para retirar los restos de GST que se hubiesen desprendido de la columna junto con nuestra proteína tras el corte. Finalmente, se eliminaron las agarosas por filtración, se concentró el sobrenadante y se determinó la cantidad de proteína presente en la muestra.

El GST que había quedado dentro de la columna tras el corte se eluyó con el tampón de elución empleado en la purificación de las proteínas recombinantes de fusión con GST: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 3 mM y glutatión 10 mM.

2.8. Ensayos de interacción *in vitro* de proteínas recombinantes (*pull-down*)

En la mayoría de los casos, los ensayos de interacción se realizaron entre una proteína recombinante fusionada a GST y proteínas recombinantes a las que previamente se había cortado el *tag*. Las proteínas sin GST se incubaron solas (control negativo), con GST recombinante (Z02039, *GenScript, USA*, control negativo) o junto con la proteína fusionada a GST correspondiente en 450 μ l de tampón HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, surfactante P20 0,005 % (*HBS-EP Buffer, BR-1001-88, GE Healthcare*). Transcurrido este tiempo, se añadió a la solución 40 μ l de glutatión agarosa (17-0756-01, *GE Healthcare*) para la unión del GST o de la proteína fusionada a GST, y se prolongó la incubación 1 hora más. Los pellets obtenidos por centrifugación se lavaron tres veces con 200 μ l de tampón HBS-EP en un filtro con tamaño de poro de 0,22 μ m (*Ultrafree-MC 0.22 μ m Centrifugal Filter Units, UFC30GV00, Millipore*). El último precipitado se solubilizó en el tampón de carga *Laemmli 2X* para su análisis por SDS-PAGE.

En la interacción entre subunidades G α i2/z con las proteínas HINT1 y RGSZ2, las subunidades G α i2/z se incubaron previamente con GTP γ S 10 μ M en 50 μ l del tampón HBS-EP durante 30 min. El exceso de GTP γ S se eliminó mediante filtros con un límite nominal de peso molecular de 10 KDa (*Amicon Microcon YM-10, #42407, Millipore*). Tanto en este caso como en el de la interacción de subunidades G α i2/z no activadas con HINT1, ninguna de las proteínas recombinantes llevaba fusionado el *tag* de GST. Por ello, los complejos proteicos formados se precipitaron incubando la mezcla 1 hora con un anticuerpo biotinado y añadiendo, posteriormente, estreptavidina agarosa (#17-5113-01 *Amersham Biosciences*), que se dejó 40 minutos en la mezcla de incubación para la interacción con la biotina. Los pellets obtenidos por centrifugación se procesaron de igual modo que en el ensayo de proteínas con *tag* de GST.

2.9. Ensayos de fosforilación de proteínas recombinantes

La fosforilación de la subunidad NR1 C0/C1/C2_{CT} del NMDA se llevó a cabo a temperatura ambiente en 50 μ l del tampón NaHEPES 60 mM pH 7,5, MgCl₂ 3 mM, MnCl₂ 3 mM, ortovanadato sódico 3 μ M, DTT 1 mM y ATP 250 μ M, en presencia de PKC γ 30 nM. La reacción se paró después de 20 minutos, tras la adición del inhibidor de PKC Gö7874 (#365252, *Calbiochem*) a una concentración de 5 μ M.

La fosforilación mediada por PKC γ del complejo HINT1-RGSZ2 pre-ensamblado se estudió añadiendo diferentes concentraciones de la quinasa (30, 60, 90 nM y 0,3 μ M) en 100 μ l de tampón quinasa (descrito en el párrafo anterior).

En otro grupo de ensayos, el efecto de una dosis fija de PKC γ (30 nM) sobre el complejo RGSZ2-HINT1 se analizó en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de G α GTP γ S (50, 100 y 150 nM). Las subunidades G α GTP γ S se incubaron junto con HINT1 y RGSZ2 durante 15 minutos para después añadir la PKC γ en 100 μ l del tampón quinasa. Después de 20 minutos, el ensayo de fosforilación se paró con el inhibidor de PKC Gö7874.

2.10. Resonancia de plasmón superficial (SPR)

La resonancia de plasmón superficial es de gran interés en investigación biomédica ya que permite la monitorización a tiempo real de interacciones moleculares y la obtención de la cinética de las mismas (Torreri y col., 2005). En la SPR se detectan variaciones en el índice de refracción de una superficie (chip) como consecuencia de los cambios de masa ocasionados por la interacción entre dos moléculas: el ligando, anclado a la superficie del chip, y el analito, que se encuentra en solución y pasa sobre el chip de forma continua gracias a un sistema de bombeo. Cuando el analito se une al ligando la masa aumenta y cuando se disocia la masa disminuye, produciendo cambios en el índice de refracción que se plasman en un sensograma, en el que se representa el cambio en la señal de resonancia (unidades de resonancia o RUs) en función del tiempo (figura 13).

Nuestras interacciones se determinaron con un equipo BIACORE X (*GE Healthcare*). Cualquier equipo de *Biacore* comprende un detector, un chip sensor y un sistema de bombeo para el transporte del analito hasta el punto de adsorción y detección. Se empleó un chip CM5 (*BR-1000-14, GE Healthcare*) de vidrio recubierto con una fina capa de oro modificada con una capa de dextrano carboximetilado, para evitar la desnaturalización del ligando. El chip consta de dos celdas, la primera se usó como celda control y en la segunda se unió el ligando a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ mediante acoplamiento de aminas a pH 7 (*BR-1000-50, GE Healthcare*). La superficie del sensor se equilibró con el tampón HBS-EP (*BR-1001-88, GE Healthcare*) y los sensogramas se recogieron a 25 °C después de hacer pasar sobre la superficie del sensor 75 μl de una solución de analito, con un flujo de 5 $\mu\text{l/min}$. La superficie del chip CM5 se regeneró después de cada ciclo con dos pulsos de 15 μl de glicina 10 mM pH 2,5 (*BR-1003-53, GE Healthcare*) dados en intervalos de 30 segundos. Se estudiaron concentraciones crecientes de analito y los resultados se analizaron con el *BIAevaluation Software* (v 4.1).

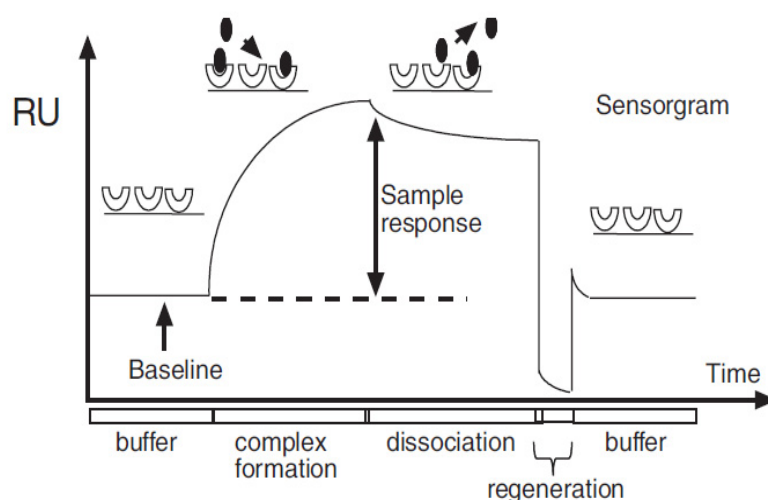


Figura 13. Sensograma de SPR. Inicialmente la solución tampón HBS-EP fluye sobre la superficie del sensor (*baseline*). Una vez inyectada la muestra que contiene el analito la pendiente ascendente de la curva indica la asociación del analito con el ligando inmovilizado (*complex formation*). Después, el analito unido se disocia, siendo arrastrado por el flujo del tampón (*dissociation*). Antes de la siguiente inyección con analito, se inyecta una solución de regeneración para arrancar el analito que todavía permanece unido a la superficie del chip hasta restablecer la línea base (*regeneration*).

2.11. Ensayos de complementación bimolecular por fluorescencia (BiFC)

El ensayo de BiFC se basa en la observación de la formación de un complejo fluorescente gracias a la interacción entre proteínas fusionadas con fragmentos complementarios de una proteína fluorescente. La asociación de las proteínas aproxima los fragmentos permitiendo la reconstitución de la proteína con su estructura tridimensional nativa que emite una señal fluorescente, permitiendo la visualización directa de la interacción en células vivas (figura 14). La fluorescencia intrínseca del complejo representa una gran ventaja del BiFC en comparación con otras técnicas, ya que permite detectar interacciones entre proteínas sin necesidad de usar ningún agente exógeno, reproduciendo lo más posible el ambiente fisiológico normal.

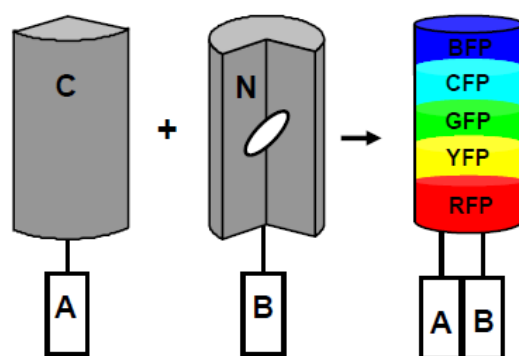


Figura 14. Principio del BiFC. Las proteínas A y B están fusionadas en sus extremos C-terminal y N-terminal, respectivamente, a dos fragmentos de una proteína fluorescente. La interacción entre las proteínas A y B facilita la aproximación entre los fragmentos no fluorescentes que reconstituyen la proteína fluorescente nativa, permitiendo la visualización directa de la interacción en células vivas. BFP, *Blue Fluorescent Protein*; CFP, *Cyan Fluorescent Protein*; GFP, *Green Fluorescent Protein*; YFP, *Yellow Fluorescent Protein*; RFP, *Red Fluorescent Protein*. (Shyu y col., 2007).

El método BiFC fue descrito originariamente con la proteína fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) (Ghosh y col., 2000). En la actualidad, se ha demostrado la aplicación de numerosos fragmentos procedentes de otras proteínas fluorescentes; en este estudio, se han empleado los vectores pBiFC-VN173 y pBiFC-VC155, que contienen fragmentos de la proteína fluorescente Venus (Nagai y col., 2002), una variante

mutagénica de la proteína YFP (*Yellow Fluorescent Protein*). En concreto, VN173 contiene los aminoácidos 1-172 del extremo amino terminal de Venus y VC155 el fragmento carboxilo terminal truncado en el residuo 155. Además, estos vectores tienen fusionados en sus extremos amino terminales epítomos de FLAG y hemaglutinina (*tags*) para facilitar la identificación de las proteínas clonadas mediante inmunodetección.

2.11.1. Clonaje para BiFC

Las secuencias de HINT1, RGSZ2, CB1R, NR1 C0/C1/C2 y MOR1 se amplificaron mediante PCR con la ADN polimerasa *Accuprime Pfx* (12344024, *Accuprime Pfx DNA Polymerase, Invitrogen*). Se emplearon *primers* que contenían las dianas de restricción más los nucleótidos necesarios para la introducción de las secuencias en el marco de lectura adecuado para la expresión del fragmento fluorescente correspondiente fusionado a la proteína de interés (tabla 3 del apartado materiales, página 63).

Tanto los insertos como los vectores se cortaron con las enzimas de restricción correspondientes y se purificaron con el kit *Purelink® PCR Purification* (K3100-02, *Invitrogen*). Tras la purificación de los vectores, estos se trataron con fosfatasa alcalina de gamba (*EF0511, Fermentas*) que elimina los grupos fosfato de los extremos 5' evitando la recircularización de los mismos y aumentando la eficiencia de la reacción de ligación inserto-vector. Los productos de ligación se transformaron en células competentes TOP-10 (*C4040-06, One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli, Invitrogen*) para su replicación y los clones obtenidos se analizaron por restricción y secuenciación. Todos los cultivos se crecieron aeróbicamente en medio LB-ampicilina (100 µg/ml).

2.11.2. Transfección

Se emplearon células CHO sembradas en placas de 8 pocillos con fondo de vidrio (155411, *Lab-Tek™ Chambered Coverglass, Nunc*) a una densidad de $1,3-1,5 \times 10^5$ células/pocillo. Veinticuatro horas después de la siembra, cuando las células habían alcanzado un 70-80 % de confluencia, se transfectó cada pareja de constructos, en

proporción 1:1; utilizando Lipofectamina 2000 (11668-019, Invitrogen) en medio *Opti-MEM*® con *Glutamax* (51985-026, Invitrogen).

2.11.3. Detección de las señales fluorescentes

Las células se incubaron durante 18-36 horas para la maduración del fluoróforo. La señal fluorescente procedente de la interacción proteica se detectó a una longitud de onda de 514 nm en un microscopio de fluorescencia confocal Leica DMIII 6000 CS equipado con un escáner láser TCS SP5.

2.12. Inmunocitoquímica

2.12.1. Marcaje intracelular de CB1R en astrocitos corticales

Las células procedentes de un cultivo enriquecido en astrocitos de 12 días se sembraron sobre placas cubreobjetos de vidrio de 10 mm, previamente recubiertas de poli-D-lisina 10 µg/ml. Habiendo transcurrido al menos 24 horas desde la siembra en cubre de los astrocitos, se trataron durante 1 hora en estufa a 37 °C y 5 % de CO₂ con el agonista cannabinoide WIN55.212-2 a una concentración 1 µM o con el correspondiente vehículo. Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído al 4 %, para conservar las células en un estado lo más parecido posible en morfología y composición química al estado vivo. Sobre dichos cubres se procedió a realizar la inmunocitoquímica siguiendo los siguientes pasos.

En primer lugar, se incubaron las células a temperatura ambiente 45 minutos en tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,4, suero de cabra 10 % (16210-064, Invitrogen) y Tritón X-100 0,1 % (T9284, Sigma-Aldrich), para abrir poros en la membrana plasmática por donde poder acceder al interior de la célula y para bloquear los lugares inespecíficos de reconocimiento para los anticuerpos. A continuación, los cultivos se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios dirigidos frente al extremo amino terminal o frente al primer bucle extracelular del CB1R (ambos a 1:500) en el mismo tampón empleado para la permeabilización de las células. Se eliminó el exceso de

anticuerpo con 3 lavados con PBS 0,1 M pH 7,4, y se incubaron una hora a temperatura ambiente y en oscuridad con un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo que emite fluorescencia a una longitud de onda de 488 nm (*Alexa 488*, 1:200), en el mismo tampón de permeabilización empleado anteriormente.

Tras otros tres lavados con PBS 0,1 M pH 7,4 se procedió al montaje sobre portaobjetos de vidrio utilizando *Mowiol* suplementado con un fluoróforo que se une a regiones del ADN ricas en adenina y citosina (*4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride* o DAPI) para su observación en un microscopio confocal de fluorescencia (*Leica DMII 6000 CS*) equipado con un escáner láser TCS SP5.

2.12.2. Marcaje en superficie de CB1R en astrocitos corticales vivos

Para el marcaje antigénico del CB1R en superficie, se utilizaron astrocitos sin tratar y tratados con WIN55.212-2 1 μ M durante 1 hora. Durante el tratamiento, se incubaron en paralelo el anticuerpo primario (Nt o 1EL, 1:500) junto con el secundario conjugado con el fluoróforo *Alexa fluor 488* (1:200) durante una hora en PBS 0,1 M pH 7,4 con albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % y en oscuridad.

Las células tratadas y sin tratar se lavaron 3 veces con PBS 0,1 M pH 7,4 y se incubaron a temperatura ambiente con la mezcla de anticuerpos primario y secundario. Después de 30 minutos, se volvieron a lavar por triplicado y se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 7 minutos. Las muestras se procesaron siguiendo los pasos descritos en el apartado anterior para su visualización en el microscopio confocal de fluorescencia (*Leica DMII 6000 CS*).

Resultados

1. Asociación GPCRs-NMDAR en tejido neural de ratón

1.1. Interacción física directa MOR-NMDAR: implicación de su secuencia C-terminal

Con el fin de determinar la existencia de una asociación entre MORs y NMDARs, se analizó en primer lugar si ambos receptores co-inmunoprecipitaban en membranas sinaptosomales de diferentes estructuras del SNC de ratón. Para ello, las proteínas de membranas P2 procedentes de corteza, estriado, médula espinal, cerebelo y PAG se solubilizaron en un tampón que contenía Nonidet NP-40, inhibidores de proteasas y fosfatasas. El MOR presente en el tejido solubilizado se inmunoprecipitó con un anticuerpo biotinado dirigido frente al segundo bucle extracelular del receptor. Los complejos proteicos obtenidos, previa limpieza de las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE para la posterior inmunodetección de las subunidades NR1, NR2A/B/C y NR3A/B en PAG y de la subunidad NR1 en el resto de estructuras del SNC. En PAG, el MOR coprecipitó con subunidades NR1 pero la asociación del receptor con subunidades NR2/3 fue escasa o nula (figura 15A). En corteza cerebral, la subunidad NR1 coprecipitó con el receptor opioide, sin embargo, dicha asociación fue menor en estriado y médula espinal y casi no se observó en cerebelo (figura 15B).

Por otro lado, membranas sinaptosomales de PAG previamente solubilizadas se incubaron con IgGs biotinadas dirigidas frente a una secuencia peptídica extracelular de la subunidad NR1 (aminoácidos 482-496). Los complejos proteicos asociados a la NR1 se precipitaron con estreptavidina agarosa y finalmente se separaron mediante SDS-PAGE, tras eliminar los restos de IgGs. Utilizando anticuerpos específicos dirigidos frente a las variantes 1 y 1C del MOR, se observó la coprecipitación de MOR1 y MOR1C con la subunidad NR1 del NMDAR (figura 15C).

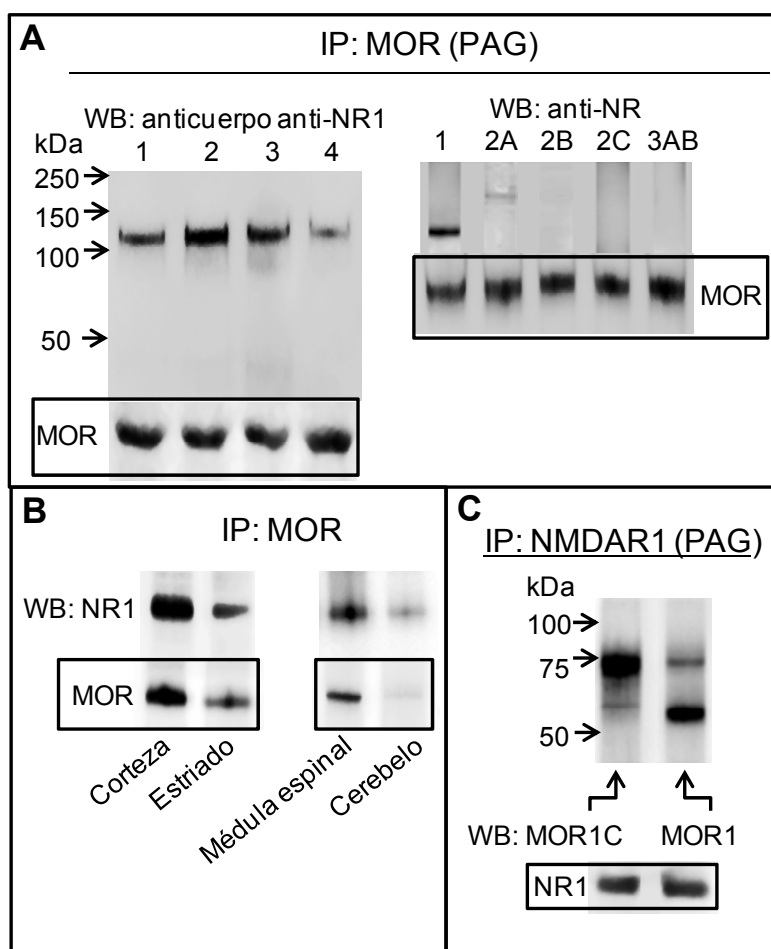


Figura 15. MOR1 y NMDAR están asociados en sistema nervioso. (A) Coprecipitación de subunidades del NMDAR con MOR en PAG de ratón. Para el ensayo de asociación MOR-NR1 en PAG, la detección se realizó con varios anticuerpos anti-NR1 de la siguiente forma: calle 1, *Abcam ab1880*; calle 2, *Abcam ab28669*; calle 3, *Sigma-Genosys (482-496)*; calle 4, *Abnova PAB12221*. Para el ensayo de asociación entre MOR y las distintas subunidades del NMDAR la disposición de los anticuerpos es la que sigue: calle 1, NR1 *Abcam ab 1880*; calle 2, NR2A *Abcam ab14596*; calle 3, NR2B *Abcam ab14400*; calle 4, NR2C *Abcam ab110*; calle 5, NR3AB *Abcam ab2639*. **(B) Coprecipitación de subunidades NR1 con MOR en diferentes áreas del SNC de ratón.** Para la detección de subunidades NR1 asociadas al MOR se empleó el anticuerpo de *Abcam ab1880*. **(C) Coprecipitación de MOR1 y MOR1C con la subunidad NR1 en PAG de ratón.** La detección se realizó con anticuerpos dirigidos frente MOR1 Ct (producción propia) y MOR1C (*Neuromics; RA20001*). Las determinaciones mostradas en los paneles A, B y C se hicieron por triplicado, empleando tejido procedente de grupos independientes de 8-10 ratones. IP: inmunoprecipitación; WB: western-blot.

Una vez confirmada la coprecipitación del MOR con la subunidad NR1, se procedió a estudiar las variantes de la subunidad NR1 asociadas al MOR en membranas sinaptosomales de PAG. La inmunoprecipitación del MOR con un anticuerpo biotinado frente al segundo bucle extracelular del receptor, reveló la asociación del receptor con las variantes C2 y C2' (figura 16).

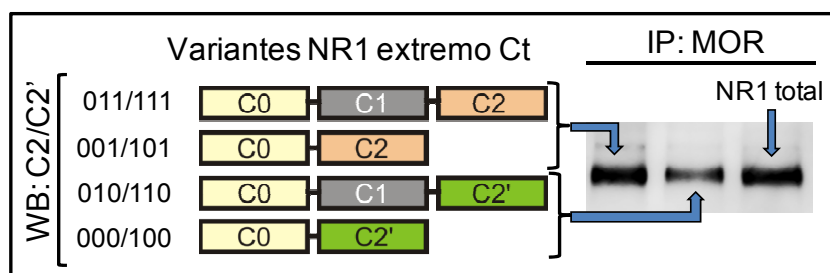


Figura 16. Variantes de la subunidad NR1 asociadas con el MOR a nivel de membrana. Las subunidades NR1 que coprecipitaron junto con el MOR se detectaron con anticuerpos dirigidos frente a diferentes regiones de la secuencia C-terminal de NR1: calle 1, NMDAR1 C2 (*Abcam, ab6485*); calle 2, NMDAR1 C2' (*Abcam, ab6486*); calle 3, NMDAR1 (*Abcam, ab1880*). La determinación se hizo por triplicado, empleando tejido procedente de grupos independientes de 8-10 ratones. IP: inmunoprecipitación; WB: western-blot.

La coprecipitación de MOR y NMDAR sugiere que ambos receptores pueden existir formando complejos o encontrarse muy próximos en diferentes estructuras del SNC. Para determinar si la asociación MOR-NMDAR puede ser directa, se hicieron ensayos de interacción *in vitro*. Se utilizaron las proteínas recombinantes correspondientes a los extremos C-terminales de las subunidades NR1 C0/C1/C2 (NR1 C0/C1/C2_{CT}: G₈₂₇-S₉₃₈) y NR1 C0/C2 (NR1 C0/C2_{CT}: G₈₂₇-S₉₀₁), ambas sin GST, y los extremos citosólicos del receptor MOR1 o MOR1C fusionados a su respectivos tags de GST (GST-MOR1_{CT}: A₂₈₇-P₃₉₈; GST-MOR1C_{CT}: F₃₃₈-R₄₃₈). Para descartar interacciones inespecíficas, las proteínas NR1 se incubaron con GST recombinante (100 nM) o con agarosa.

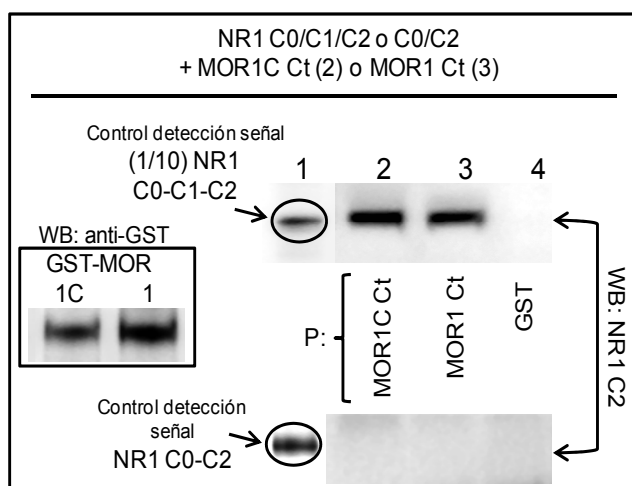


Figura 17. Asociación directa de los extremos C-terminales de MOR1 y MOR1C con NMDAR. Se realizó un ensayo de interacción *in vitro* en el que las variantes C-terminales de NR1 C0/C1/C2 (100nM) o de NR1 C0/C2 (100 nM) se incubaron con GST-MOR1C_{CT} (100 nM) (calle 2) o con GST-MOR1_{CT} (100 nM) (calle 3). El GST no se unió a la NR1 C0/C1/C2 ni a la NR1 C0/C2 (calle 4). La primera calle corresponde a la cantidad de NR1 C0/C1/C2 (1/10 del total empleado) y NR1 C0/C2 utilizadas en el ensayo. A la izquierda, el control de detección de la señal correspondiente a 100 nM de GST-MOR1C_{CT} y GST-MOR1_{CT}. P: precipitado con glutatión agarosa; WB: western blot, anticuerpos anti-GST y anti-NMDAR1 C2.

Los extremos C-terminales de las dos variantes del MOR, acopladas a glutatión agarosa, se unieron y coprecipitaron con la secuencia citosólica C0/C1/C2 de NR1 pero no con la C0/C2 ni con GST (figura 17). Estos resultados indican que el MOR puede acoplarse directamente al NMDAR y que el segmento C1 de la subunidad NR1 juega un papel esencial.

La asociación MOR-NR1 se corroboró con un análisis mediante resonancia de plasmón superficial, que permite la detección de interacciones proteicas en tiempo real. Los segmentos C-terminales de las variantes C0/C1/C2 o C0/C2 de NR1 (50 µg/ml) se inmovilizaron por su N-terminal en el segundo canal de un chip sensor CM5 por acoplamiento de aminas a pH 7, mientras que el primer canal del chip se utilizó como control. Diferentes concentraciones de la proteína MOR1_{CT} (0,5, 1, 3, y 8 µg/ml en el ensayo con NR1 C0/C1/C2 y una concentración más alta, 10 µg/ml, en el ensayo con NR1 C0/C2) se pasaron sobre el chip con un flujo constante de 5 µl/min. Se observó una fuerte interacción entre el extremo C-terminal del receptor MOR1 y de la subunidad NR1 C0/C1/C2, sin embargo, no se vio interacción entre el receptor y la subunidad NR1 C0/C2 (figura 18).

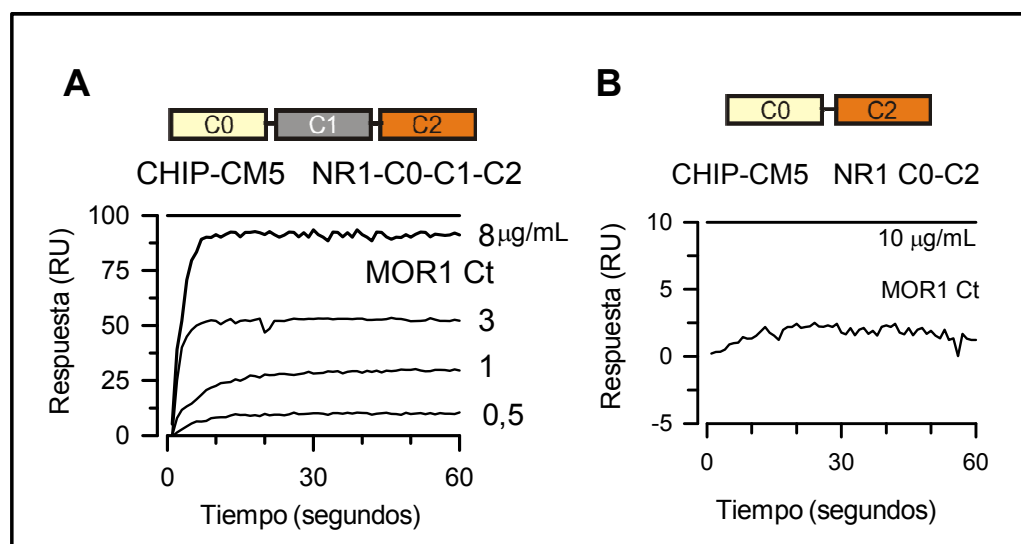


Figura 18. Asociación directa del extremo C-terminal de MOR1 con NMDAR mediante SPR. Diferentes concentraciones de la proteína MOR1_{CT} en solución (0,5, 1, 3, y 8 µg/ml en el ensayo con NR1 C0/C1/C2 y 10 µg/ml en el ensayo con NR1 C0/C2) se pasaron sobre un chip CM5 que llevaba acoplada bien la proteína NR1 C0/C1/C2 (A) o bien la NR1 C0/C2 (B), con un flujo constante de 5 µl/min.

Finalmente, mediante estudios de complementación bimolecular por fluorescencia, se analizó si estos receptores pueden interactuar de forma directa en células vivas. Esta aproximación permite la detección de interacciones proteicas directas en un ambiente celular normal. Para ello, se transfectaron células CHO con una mezcla (1:1) de los plásmidos que contenían las secuencias completas de MOR1 y de la variante C0/C1/C2 de la NR1 acopladas al fragmento C-terminal (residuos 155-238) y N-terminal (residuos 1-172) de la proteína Venus, respectivamente. La interacción física de las proteínas en estudio permite la aproximación de los segmentos N- y C-terminales de Venus, que se acoplan reconstituyendo la proteína en su conformación nativa, que emite fluorescencia. La señal fluorescente se detectó a 514 nm en numerosas células, indicando que MOR y NR1 pueden formar heterodímeros *in vivo* (figura 19). Como los fragmentos VN y VC no son fluorescentes por sí solos, las células que no emitieron fluorescencia no debían estar transfectadas o se habían transfectado solamente con uno de los dos plásmidos.

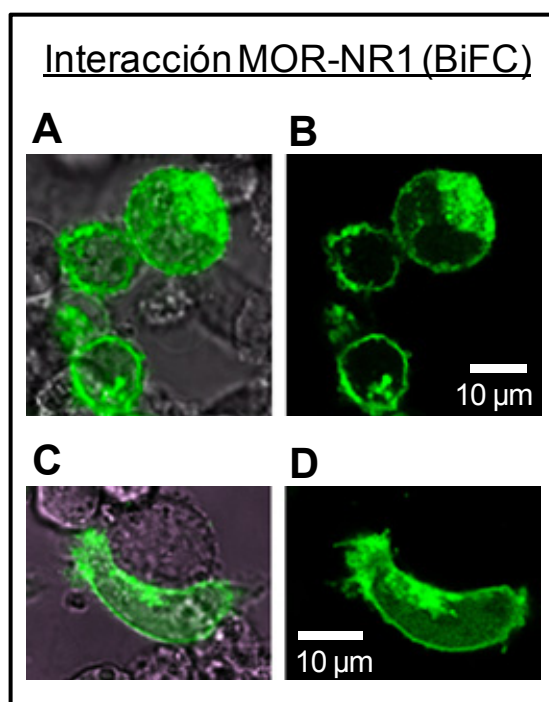


Figura 19. MOR1 interacciona físicamente con NMDAR *in vivo*. Visualización de la interacción de MOR1 con NR1 C0/C1/C2 mediante BiFC, con células CHO co-transfectadas con el ADNc codificante para MOR1^{VC155} y NR1 C0/C1/C2^{VN173} en proporción 1:1 (0,3 µg). A y C: imágenes combinadas de contraste de fase y fluorescencia; B y D: imágenes de fluorescencia. Objetivo 63 X, zoom 3.

1.1.1. Efecto de la morfina en la asociación entre MOR y NR1

A fin de explorar el significado funcional de esta asociación, se determinó el efecto de la administración *in vivo* de morfina en la estabilidad del complejo MOR-NMDAR, que se analizó *ex vivo* en membranas sinaptosomales de PAG.

Los animales recibieron una dosis de 10 nmol/ratón de morfina vía icv y se separaron en grupos de 6 ratones para su posterior sacrificio a los 15, 30, 60 minutos, 3, 6 y 24 horas post-inyección. Se extrajeron sus PAG, a partir de los cuales se obtuvieron las membranas sinaptosomales que, una vez solubilizadas, se incubaron con IgGs biotinadas dirigidas frente al segundo bucle extracelular del MOR. Las proteínas precipitadas se separaron en geles de SDS-PAGE y se analizó la presencia de la subunidad NR1 y del marcador postsináptico PSD-95 asociados al receptor con anticuerpos específicos anti-NR1 y anti-PSD-95. En concordancia con anteriores resultados (Rodríguez-Muñoz y col., 2007c), la administración icv de una dosis de 10 nmol de morfina no produjo cambios significativos en los niveles del MOR en membrana. La asociación entre las subunidades NR1 y el receptor opioide apenas disminuyó en el período en el que la dosis de 10 nmol de morfina produjo su efecto analgésico, después esta asociación decreció paulatinamente alcanzando un máximo de separación de aproximadamente el 50 % a las 24 horas post-inyección (figura 20A). La asociación del MOR con PSD-95 también disminuyó en respuesta a morfina paralelamente a la separación del receptor opioide y las subunidades NR1 (figura 20B); la conexión del MOR con esta proteína indica que la interacción MOR-NR1 se da en la membrana postsináptica.

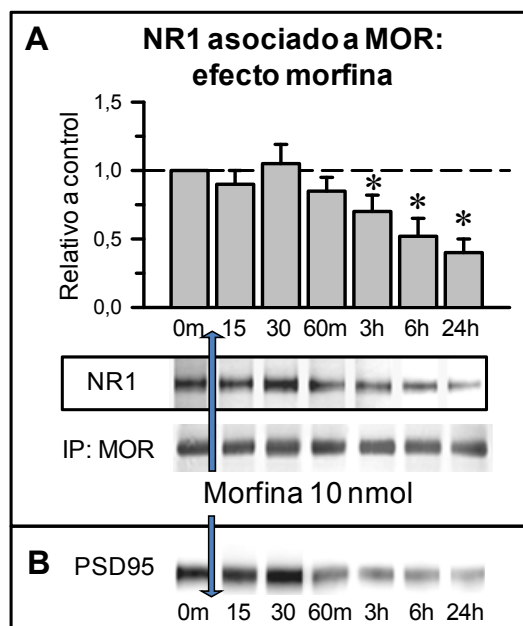


Figura 20. La morfina reduce la asociación del MOR con subunidades NR1 (A) y PSD-95 (B). Los animales recibieron una dosis de 10 nmol/ratón de morfina vía icv y se sacrificaron a los 15, 30, 60 minutos, 3, 6 y 24 horas de la inyección. En la figura 20A, las señales inmunodetectadas (densidad óptica media de los píxeles dentro del área estudiada/mm²) se expresan en función de los niveles de MOR observados en los ratones control, que no habían recibido morfina (a los que se ha dado un valor arbitrario de 1). Cada determinación se repitió tres veces con PAG procedente de grupos independientes de 6 animales. Cada valor es la media±ESM. * Estadísticamente significativo respecto al grupo control. ANOVA-Student-Newman-Keuls test; $p<0,05$. IP: inmunoprecipitación.

Paralelamente, en estos mismos grupos de ratones se detectó un aumento de la fosforilación activadora de la serina 890 de la subunidad NR1, de la tirosina 1325 de NR2A así como de la autofosforilación de la CaMKII en la treonina 286. Las subunidades de NR1 asociadas con el MOR no estaban fosforiladas en el residuo de serina 890 (figura 21).

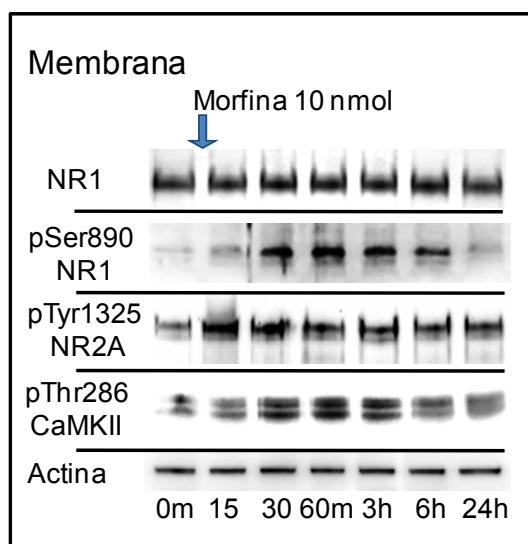


Figura 21. Estudio de las fosforilaciones implicadas en la actividad NMDAR-CaMKII en ratones tratados con morfina. Se analizó la presencia de NR1 y de las fosforilaciones activadoras de NR1, NR2A y CaMKII en membranas sinaptosomales de PAG. El ensayo se repitió tres veces con muestras procedentes de grupos independientes de 6 animales. La actina se utilizó como control de carga.

En una segunda fase del estudio, se evaluaron las posibles modificaciones en la asociación entre MOR y NR1 tras una segunda dosis de morfina. Los animales recibieron una dosis inicial de 10 nmol/ratón de morfina y, pasadas 24 horas, se les administró otra dosis de morfina similar a la anterior (10 nmol/ratón) o salino. Los ratones se sacrificaron a los 15, 30 minutos, 3 y 24 horas post-inyección. Para cada intervalo de tiempo estudiado, se prepararon las membranas sinaptosomales de los PAGs pertenecientes a 6 ratones, que se solubilizaron en tampón Nonidet NP-40 1 %. Se inmunoprecipitó al MOR (IP) con un anticuerpo dirigido frente a su segundo bucle extracelular y se analizó su presencia en membrana y las subunidades NR1 asociadas a él. En estas circunstancias, la morfina no produjo cambios significativos con respecto a los niveles de asociación MOR-NR1 observados a las 24 horas post-inyección; aunque la segunda dosis del opioide redujo el número de MORs en superficie (figura 22).

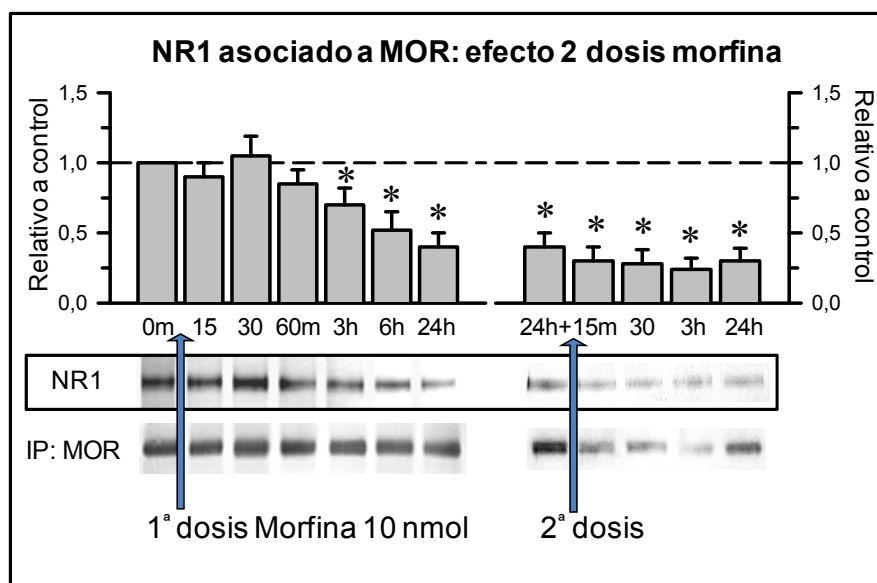


Figura 22. Efecto de la administración repetida de morfina en la asociación MOR-NR1. Las señales inmunodetectadas (densidad óptica media de los píxeles dentro del área estudiada/mm²) se expresan en función de los niveles de MOR observados en los ratones control (tiempo 0 m), que no habían recibido morfina. Cada determinación se repitió tres veces con PAG procedente de grupos independientes de 6 animales. Cada barra representa la media±ESM de los valores obtenidos. * Estadísticamente significativo respecto al grupo control. ANOVA-Student-Newman-Keuls test; $p < 0,05$.

1.1.2. Papel de la PKC en la interacción entre MOR y NMDAR

Los residuos de serina 890, 896 y 897 localizados en la región C1 de la subunidad NR1 están implicados en la regulación por PKC y PKA de la función del NMDAR (Hisatsune y col., 1997; Tingley y col., 1997). Tras exponer el segmento C-terminal de la proteína NR1 C0/C1/C2 a la acción de la PKC γ , la interacción entre MOR1 y NR1 se vio muy disminuida (figura 23). El análisis de la secuencia C-terminal de la NR1 C0/C1/C2 (DNASTAR; Protean v8.0.2), reveló la presencia de un grupo de residuos cargados positivamente al final del segmento C1 (889-898: SSFKRRRSSK) que podría interaccionar con las regiones negativas del extremo C-terminal de los receptores MOR1 y MOR1C. La fosforilación de residuos de serina del segmento C1 de la NR1 reduce la carga positiva, debilitando la asociación entre MOR y NR1. El punto isoeléctrico varía de 11,72 a 9,98 (P), 7,61 (P-P), y 6,8 (P-P-P) (Expasy's Compute pI/Mw).

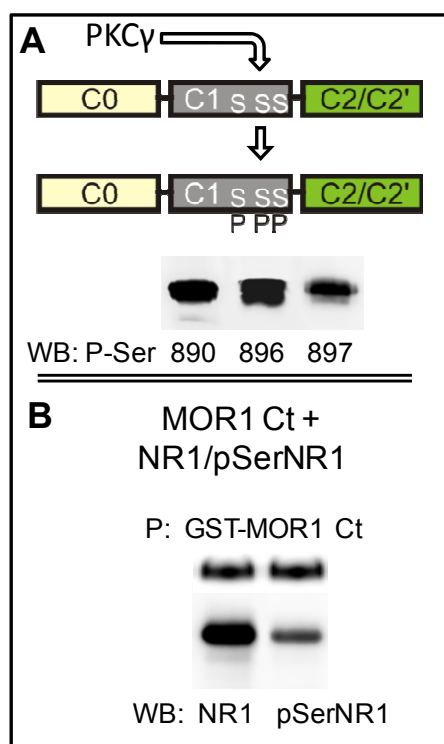


Figura 23. Influencia de la PKC en la asociación entre los extremos C-terminales de MOR1 y NR1. (A) Fosforilación de la proteína recombinante NR1 C0/C1/C2_{CT} (100 nM) en presencia de PKC γ (30 nM). El análisis por *western-blot* reveló la fosforilación de los residuos de Ser890, Ser896 y Ser897 del segmento C1 de la NR1. **(B)** La proteína GST-MOR1_{CT} (100 nM) se incubó junto con la NR1 C0/C1/C2_{CT} (100 nM) pre-expuesta o no a la PKC γ . La GST-MOR1_{CT} se precipitó (P) con glutatión agarosa y las subunidades NR1 asociadas se evaluaron por *western-blot* (WB) utilizando un anticuerpo dirigido frente a una secuencia del segmento C2 de la NR1.

1.2. Interacción física directa CB1R-NMDAR: implicación de su secuencia C-terminal

Una vez descrita la asociación MOR-NMDAR, quisimos extender el estudio a otros receptores G caracterizando el tipo de interacción existente entre CB1R y NMDAR. Como punto de partida, se estudió la posible coprecipitación de ambos receptores en membranas sinaptosomales de PAG de ratón. Las proteínas de las membranas P2 de PAG se solubilizaron en un tampón con Nonidet NP-40 al 1 %, en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas para evitar su degradación así como su posible fosforilación o defosforilación. Mediante inmunoprecipitación, se aisló al CB1R junto con las proteínas asociadas a él. Tras la separación mediante SDS-PAGE, se determinó la presencia en los inmunocomplejos de las subunidades NR1, NR2A/B/C y NR3A/B con anticuerpos específicos. En PAG, el CB1R coprecipitó con subunidades NR1, sin embargo, no se observó asociación alguna entre el receptor cannabinoide y las subunidades NR2/3 (figura 24A). Por otro lado, también en membranas P2 de PAG, se llevó a cabo una inmunoprecipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente a la subunidad NR1 (aminoácidos 482-496) y una inmunodetección con IgGs anti-CB1R. Se observó una

banda inmunorreactiva entre 55-60 KDa correspondiente al CB1R que confirmó la coprecipitación de ambos receptores en PAG de ratón (figura 24B).

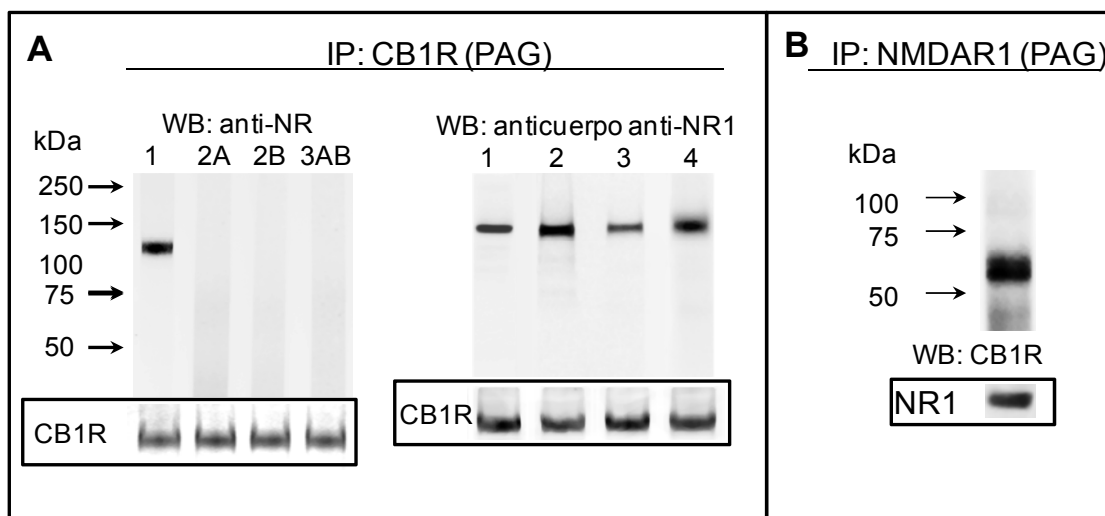


Figura 24. Los receptores CB1 y NMDA están asociados en membranas sinaptosomales de PAG de ratón. (A) Coprecipitación de subunidades del NMDAR con CB1R en PAG de ratón. Los inmunocomplejos se precipitaron con IgGs biotinadas dirigidas frente al primer bucle extracelular del CB1R. La determinación se hizo por triplicado. En la inmunodetección se emplearon anticuerpos específicos de las subunidades NR1, NR2A, NR2B y NR3AB. La disposición de los anticuerpos es la que sigue: calle 1, NR1 *Abcam ab 1880*; calle 2, NR2A *Abcam ab14596*; calle 3, NR2B *Abcam ab14400*; calle 4, NR3AB *Abcam ab2639*. Para el ensayo de asociación CB1-NR1 en PAG, la detección se realizó con varios anticuerpos anti-NR1 de la siguiente forma: calle 1, *Abcam ab1880*; calle 2, *Abcam ab28669*; calle 3, *Sigma-Genosys (482-496)*; calle 4, *Abnova PAB12221*. **(B) Coprecipitación de CB1R con la subunidad NR1 en PAG de ratón.** Se inmunoprecipitó la subunidad NR1 del NMDAR y la detección se realizó con un anticuerpo dirigido frente al primer bucle extracelular del CB1R. Las determinaciones mostradas en los paneles A y B se repitieron tres veces, con PAG procedente de grupos independientes de 6 animales. IP: inmunoprecipitación; WB: *western-blot*.

De forma similar que con el MOR, se llevaron a cabo estudios de interacción *in vitro* para el análisis de la interacción directa entre los dos receptores. En estos estudios se emplearon los fragmentos C-terminales del CB1R y de la subunidad NR1 del NMDAR, ya que ambos receptores contienen allí secuencias consenso de fosforilación y sitios potenciales de unión con proteínas importantes en señalización (Tingley y col., 1997; Wyszynski y col., 1997; Daigle y col., 2008; Smith y col., 2010). Se clonaron proteínas recombinantes fusionadas a GST correspondientes a GST-CB1R_{CT} (R₄₀₁–L₄₇₃) y a GST-NR1 C0/C1/C2_{CT} (G₈₂₇–S₉₃₈). La proteína GST-NR1 C0/C1/C2_{CT} (100 nM) se incubó junto con GST-CB1R_{CT} (100 nM) pre-acoplado a agarosa. Como controles negativos, se

incubaron GST recombinante (*GenScript, USA; Z02039*) (100 nM) con agarosa y GST-NR1 C0/C1/C2_{CT} (100 nM) con agarosa. Lo asociado a la agarosa o al CB1R_{CT} pre-acoplado a agarosa se solubilizó y se analizó por *western blot*. Como se muestra en la figura 25, el extremo C-terminal del receptor cannabinoide se unió y coprecipitó con GST-NR1 C0/C1/C2_{CT}.



Figura 25. Asociación directa entre los extremos C-terminales de CB1R y NR1 C0/C1/C2. La primera calle corresponde a la interacción entre GST recombinante y agarosa; la segunda a la interacción entre GST-NR1 C0/C1/C2_{CT} y agarosa; la calle 3 muestra la GST-NR1 C0/C1/C2_{CT} asociada al CB1R_{CT} pre-acoplado a agarosa. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente a GST y NR1 C2. WB: *western-blot*.

Este estudio de interacción *in vitro* indica que la asociación entre ambos receptores puede ser directa a través de sus extremos citosólicos. Resultado que coincide con lo observado en los ensayos de resonancia de plasmón superficial, en los que además se demostró la ausencia de interacción entre CB1R_{CT} y NR1_{CT} cuando falta la región C1 (variante C0/C2 de la NR1) (figura 26).

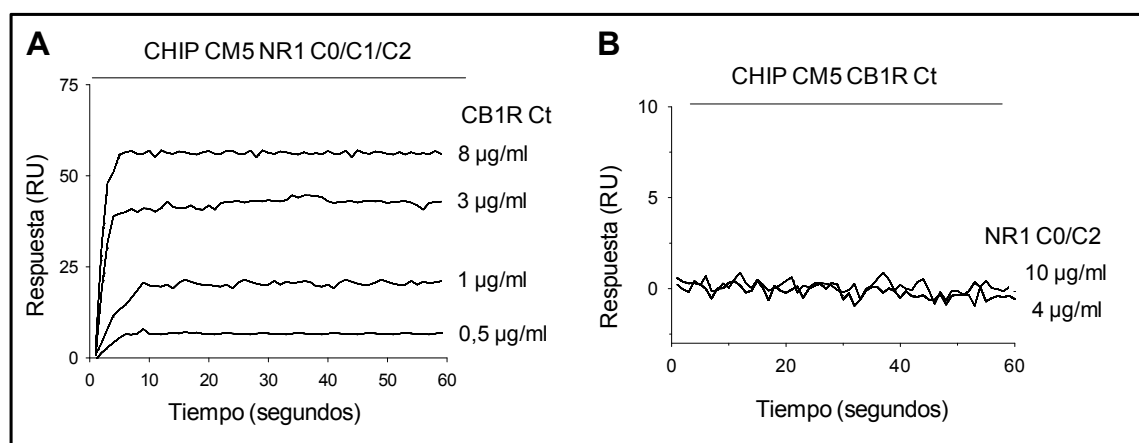


Figura 26. Asociación directa de CB1R_{CT} con la subunidad NR1 C0/C1/C2_{CT} del NMDAR mediante SPR. Diferentes concentraciones de la proteína CB1R_{CT} en solución (0,5, 1, 3, y 8 µg/ml) y de NR1 C0/C2_{CT} (4, 10 µg/ml) se pasaron sobre un chip CM5 que llevaba acoplada la proteína NR1 C0/C1/C2 (A) o el CB1R_{CT} (B), con un flujo constante de 5 µl/min.

Para confirmar la interacción entre el CB1R y la variante C0/C1/C2 de la NR1 en células vivas, se llevaron a cabo ensayos de complementación bimolecular por fluorescencia. Utilizando Lipofectamina 2000, se transfectaron 0,8 μg de los plásmidos que contenían las secuencias completas del CB1R^{VC155} (0,4 μg) y NR1 C0/C1/C2^{VN173} (0,4 μg) en células CHO. La interacción entre ambos receptores *in vivo* se detectó en un microscopio de fluorescencia confocal a 514 nm pasadas 24 horas de la transfección (figura 27).

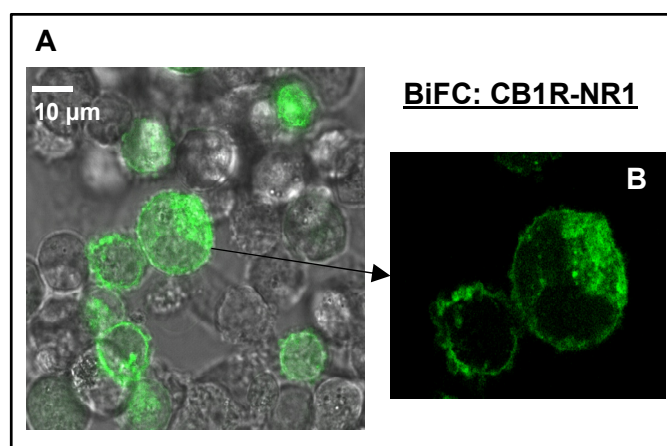


Figura 27. CB1R interacciona físicamente con NMDAR *in vivo*. Visualización de la interacción de CB1R con la variante C0/C1/C2 de la NR1 mediante BiFC con células CHO co-transfectadas con el ADNc codificante para CB1R^{VC155} y NR1 C0/C1/C2^{VN173} en proporción 1:1 (0,4 μg). A, imagen combinada de contraste de fase y fluorescencia, objetivo 63 X, zoom 3; B, imagen de fluorescencia, detalle de la imagen A.

1.2.1. Efecto de WIN55.212-2 en la asociación entre CB1R y NR1

1.2.1.1. WIN55.212-2 induce la internalización del CB1R

Tras la administración vía icv de una dosis aguda de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2, suficiente para desensibilizar la respuesta analgésica de los CB1Rs, se extrajo el PAG de los animales tratados. Se preparó la fracción sinaptosomal y citosólica de los PAGs extraídos y se realizaron ensayos de inmunoprecipitación en condiciones desnaturizantes para estudiar la presencia del CB1R en ambos compartimentos. La administración vía icv de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2 produjo una disminución de la presencia de receptores CB1 en membranas P2 de PAG desde los primeros 10 minutos, con un máximo a los 30 minutos post-inyección. Posteriormente, el número de CB1Rs en superficie fue aumentando de manera progresiva. La disminución de CB1Rs en membrana se correspondió con un aumento del receptor cannabinoide en la fracción citosólica S2 del PAG, que alcanzó un pico a los 30 minutos. Pasadas 24-48 horas, se habían recuperado los

niveles basales detectados antes de la inyección del agonista cannabinoide en ambos compartimentos (figura 28).

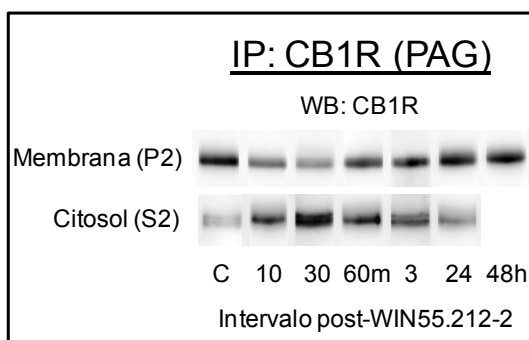


Figura 28. Influencia de WIN55.212-2 en la presencia del CB1R en superficie y citosol de PAG de ratón. Los animales recibieron una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2. Se sacrificaron a los 10, 30, 60 minutos, 3, 24 y 48 horas de la inyección. Para cada intervalo estudiado, se prepararon las membranas sinaptosomales o la fracción citosólica de PAG procedente de grupos independientes de 8 ratones, se solubilizaron con SDS en condiciones desnaturalizantes. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al primer bucle extracelular del CB1R. Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. Los receptores se detectaron con el anticuerpo dirigido frente al extremo amino del CB1R. La determinación se realizó al menos por duplicado. IP: inmunoprecipitación; WB: *western-blot*.

La internalización del receptor CB1 por WIN55.212-2 también se estudió *in vivo* en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata, que expresan el ARNm del CB1R (Bouaboula y col., 1995a) y su proteína (Sánchez y col., 1998). En primer lugar, se analizó el patrón de expresión de los CB1Rs en la superficie de los astrocitos; para ello, se incubaron los astrocitos vivos en cultivo, en ausencia de detergentes, con anticuerpos frente al N-terminal o al primer bucle extracelular del CB1R (1:500), unidos a priori con un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (*Alexa 488*, 1:200). La ausencia de detergentes hace que la bicapa lipídica permanezca intacta, de manera que las IgGs no penetran en las células vivas y solamente se unen a sus antígenos a nivel de superficie. En estas condiciones, se observó un intenso marcaje que no se detectó cuando las células se trataron previamente con WIN55.212-2, lo que indica que el agonista cannabinoide disminuye la presencia del CB1R en membrana, probablemente induciendo su internalización (figura 29 A).

Con el fin de detectar los CB1Rs internalizados, se trataron los astrocitos durante 1 hora con WIN55.212-2 1 μ M y se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Los anticuerpos primarios frente a CB1Rs (Nt y 1EL) se incubaron en presencia de Tritón X-100 0,1 %, que desorganiza la membrana lipídica permitiendo la unión de los anticuerpos con sus epítomos presentes en los CB1Rs internalizados. En estas condiciones, el tratamiento con WIN55.212-2 1 μ M fue capaz de promover la internalización de los receptores CB1 (figura 29 B).

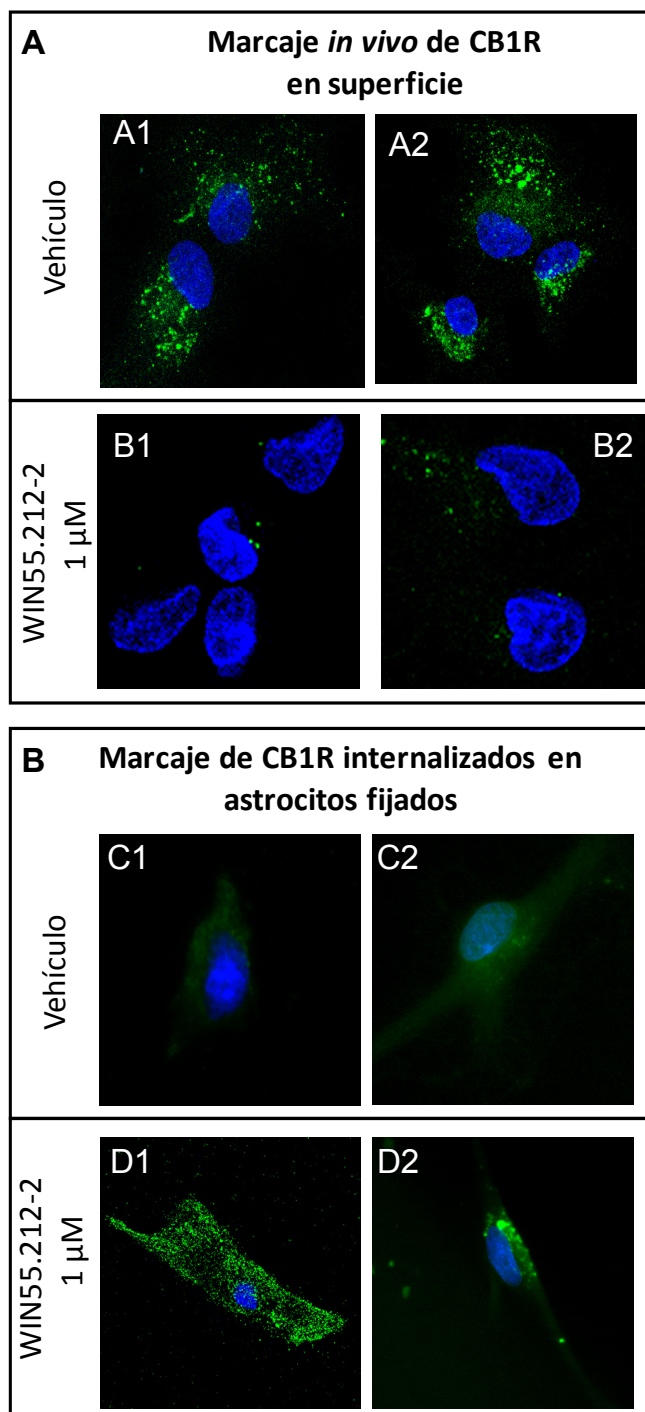


Figura 29. Internalización de los CB1Rs inducida por WIN55.212-2. (A) Marcaje de CB1Rs en superficie de astrocitos vivos. Los astrocitos se incubaron durante 1 hora con WIN55.212-2 1 μ M o el correspondiente vehículo. Posteriormente, las células tratadas y sin tratar (vehículo) se incubaron con anticuerpos anti-CB1R marcados con Alexa-488 durante 30 minutos. Se lavaron con PBS 0,1 M atemperado y se fijaron. El CB1R se marcó con anticuerpos frente al N-terminal y al primer bucle extracelular del receptor. Imágenes A1-B1: anti-CB1R-Nt; A2-B2: anti-CB1R-1EL. En verde: CB1R, en azul: núcleos con DAPI; objetivo: 63 X **(B) Marcaje de CB1Rs en astrocitos fijados.** Las células se trataron con WIN55.212-2 durante 1 hora. Tras la incubación, se fijaron e incubaron con una solución que contenía Tritón X-100 0,1 %. Los anticuerpos anti-CB1R se añadieron a la solución durante 2 horas. La detección se realizó con anticuerpos anti-CB1R-Nt en C1-D1 y anti-CB1R-1EL en C2-D2; objetivo: 63 X.

1.2.1.2. WIN55.212-2 estimula la internalización de los CB1Rs. Efecto sobre su asociación con las subunidades NR1 del NMDAR

Se analizó el efecto de una dosis aguda de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2 sobre la asociación entre los receptores CB1R y NMDAR. Los animales control y tratados con el cannabinoide se sacrificaron a diferentes intervalos tras la inyección icv. Se extrajeron sus PAG, que se solubilizaron y procesaron para la obtención de la fracción de membrana P2 y la fracción citosólica S2 donde, mediante inmunoprecipitación, se aisló el CB1R y las proteínas asociadas con él. La inmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo frente al primer bucle extracelular del CB1R y la inmunodetección con anticuerpos específicos anti-CB1R N-terminal y anti-NR1. La administración del agonista promovió la internalización del receptor cannabinoide y disminuyó la asociación de los CB1Rs que permanecieron en superficie con las subunidades NR1. El CB1R internalizado en respuesta de WIN55.212-2 no estaba asociado con la NR1; por lo tanto, la administración de WIN55.212-2 escinde la interacción entre CB1R y NR1, en un proceso que probablemente es necesario antes de la internalización del CB1R. Pasadas 24 horas, los niveles de CB1R en superficie se habían recuperado, así como su asociación con las subunidades NR1 (figura 30).

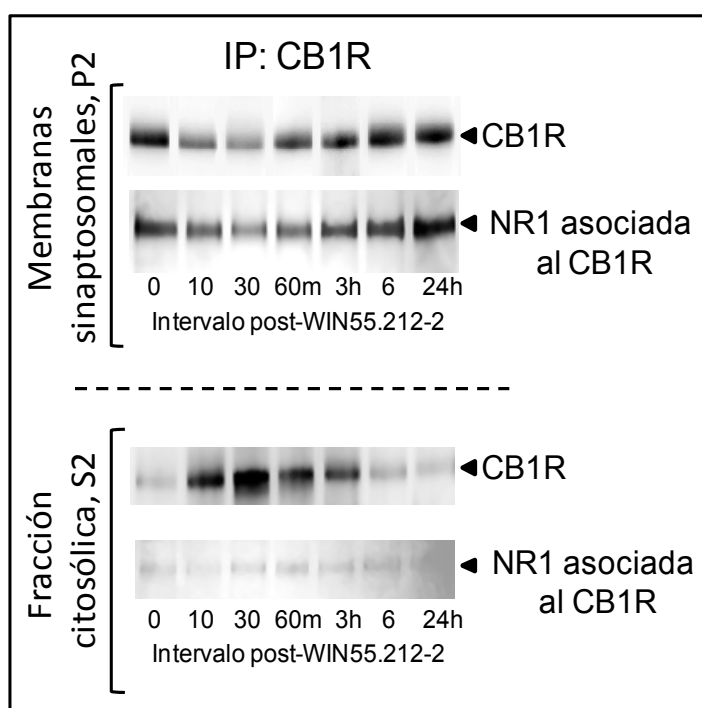


Figura 30. Efecto de la administración de WIN55.212-2 en la estabilidad de la interacción CB1R-NMDAR en PAG de ratón. Varios grupos de ratones recibieron una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2. Los animales se sacrificaron a los intervalos de tiempo indicados. Para cada intervalo estudiado, se prepararon las membranas sinaptosomales y la fracción citosólica S2 del PAG correspondiente a grupos independientes de 6 ratones. Se inmunoprecipitó (IP) al CB1R y se analizó su presencia en membrana y citosol, así como la NR1 asociada al receptor. Los ensayos se repitieron tres veces y los resultados fueron comparables.

1.2.1.3. Efecto del MK-801 en la internalización del CB1R mediada por WIN55.212-2

Partiendo de la posibilidad de que el NMDAR y el CB1R pudieran estar asociados en la fracción sinaptosomal, se procedió a estudiar cómo afecta el bloqueo del NMDAR en la endocitosis del CB1R inducida por WIN55.212-2. Se administró a un grupo de animales una dosis de 1 nmol/ratón icv de MK-801 30 minutos antes de que recibieran una inyección, también vía icv, de WIN55.212-2; otro grupo de animales se trató sólo con WIN55.212-2. Los animales se sacrificaron a los 10, 30, 60 minutos, 3, 6 y 24 horas post-inyección. Para cada intervalo estudiado, se prepararon las membranas sinaptosomales y la fracción citosólica S2 del PAG correspondiente a 6 ratones para las determinaciones *ex vivo*. Se inmunoprecipitó el CB1R utilizando un anticuerpo frente al primer bucle extracelular del receptor. Por *western-blot*, se detectó la presencia del CB1R en superficie y citosol con un anticuerpo específico frente al extremo N-terminal del receptor. La administración de WIN55.212-2 produjo en sinaptosomas la translocación del CB1R al citosol, sin embargo, la administración de MK-801 antes del tratamiento con WIN55.212-2 bloqueó la internalización del CB1R mediada por el agonista cannabinoide (figura 31).

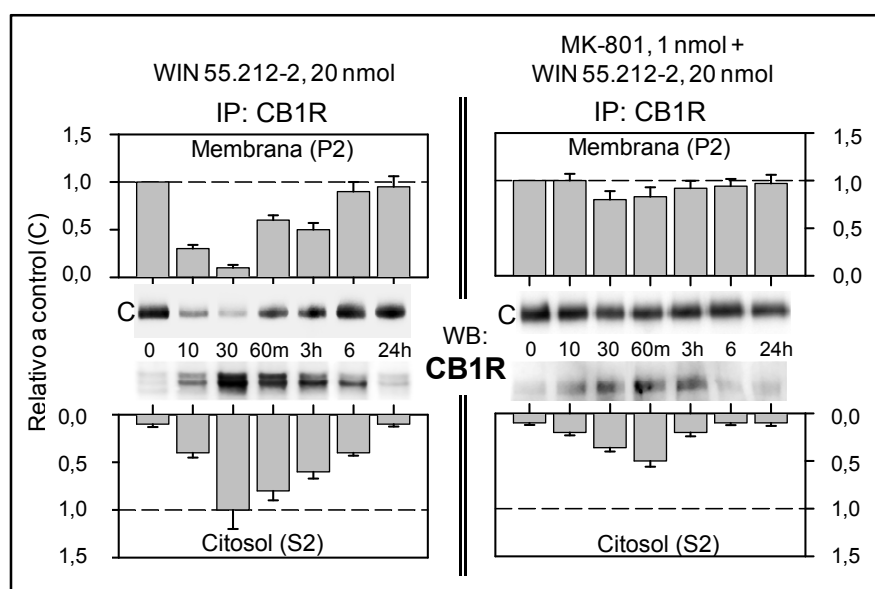


Figura 31. El MK-801 bloquea la internalización del CB1R inducida por WIN55.212-2. Las barras representan la densidad óptica media de las señales inmunodetectadas, referidas a los niveles de CB1R en membrana (P2) en ratones control (C) (a los que se ha dado un valor arbitrario de 1). Cada determinación se repitió tres veces con PAG procedente de grupos independientes de 6 animales. Cada valor es la media±ESM. IP: inmunoprecipitación; WB: *western-blot*.

En segundo lugar, se analizó el efecto del antagonista del NMDAR, MK-801, en la internalización del CB1R tras 3 dosis consecutivas de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2, separadas 3 horas entre sí. Los animales se sacrificaron a los 30 minutos de la tercera inyección del cannabinoide. Las proteínas de membranas P2 procedentes del PAG de los animales sacrificados se solubilizaron con Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40 y el CB1R presente en el tejido solubilizado se inmunoprecipitó con un anticuerpo biotinado dirigido frente al primer bucle extracelular del receptor. En la fracción citosólica S2 también se inmunoprecipitó al receptor cannabinoide utilizando el mismo anticuerpo biotinado anti-CB1R. En la figura 32, se puede observar que la administración repetida de WIN55.212-2 disminuyó significativamente la cantidad del receptor en membrana y aumentó de forma considerable su presencia en citosol

En paralelo, otro grupo de animales recibió una dosis icv de 1 nmol/ratón de MK-801 antes de las 3 dosis del agonista cannabinoide. El MK-801 fue capaz de bloquear la translocación del CB1R al interior celular (figura 32).

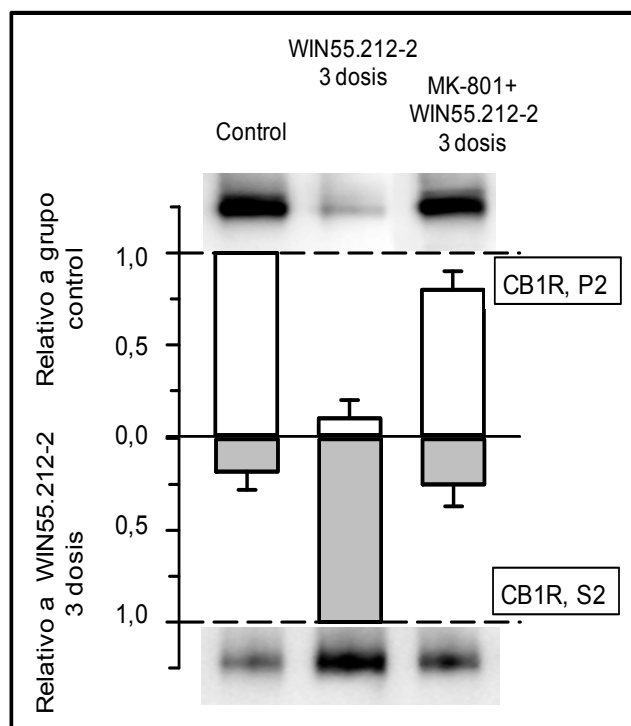


Figura 32. El MK-801 bloquea la internalización del CB1R tras la administración repetida de WIN55.212-2.

Se prepararon las membranas sinaptosomales y la fracción citosólica S2 del PAG correspondiente a 6 ratones para las determinaciones *ex vivo*. Se realizó la inmunoprecipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente a CB1R. Las señales inmunodetectadas a nivel de membrana (densidad óptica media de los píxeles dentro del área estudiada/mm²) se expresan en función de los niveles de CB1R observados en los ratones control, sin tratamiento, a los que se ha dado un valor arbitrario de 1; a nivel de citosol, se expresan en función de los niveles de CB1R detectados tras 3 dosis de WIN55.212-2. Cada determinación se repitió tres veces con PAG procedente de grupos independientes de 8 animales. Cada valor es la media±ESM.

1.2.1.4. WIN55.212-2 estimula la internalización de las subunidades NR1 asociadas al CB1R

Puesto que el bloqueo del NMDAR impide la internalización de los CB1Rs, se evaluó el efecto de la activación del receptor cannabinoide sobre el tráfico de las subunidades NR1 asociadas con él. Con este objetivo, se inmunoprecipitaron las subunidades NR1 presentes en membranas sinaptosomales P2 y en la fracción citosólica S2 del PAG de ratones que habían recibido 1 ó 3 dosis de WIN55.212-2 vía icv. Los animales se sacrificaron a la media hora del tratamiento con el cannabinoide.

Tras la inyección icv de una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55.212.2 se observó una ligera disminución en membrana de los niveles de las NR1 asociadas al receptor y un aumento de su presencia en citosol. Sin embargo, la administración repetida de 20 nmol/ratón del agonista cannabinoide (con un intervalo entre dosis de 3 horas), promovió una intensa internalización de las NR1 y, en consecuencia, un incremento significativo de su presencia en el compartimento citosólico (figura 33).

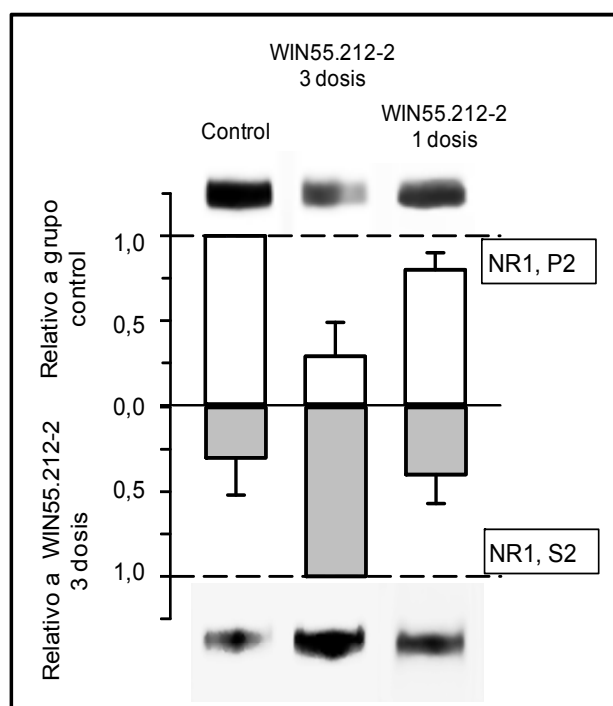


Figura 33. WIN55.212-2 internaliza las subunidades NR1 asociadas al CB1R. Se prepararon las membranas sinaptosomales y la fracción citosólica S2 del PAG correspondiente a 6 ratones para las determinaciones *ex vivo*. Se realizó la inmunoprecipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente a una secuencia peptídica extracelular de la subunidad NR1 (aminoácidos 482-496). Las señales inmunodetectadas a nivel de membrana (densidad óptica media de los píxeles dentro del área estudiada/mm²) se expresan en función de los niveles de NR1 observados en los ratones control, sin tratamiento, a los que se ha dado un valor arbitrario de 1; a nivel de citosol, se expresan en función de los niveles de NR1 detectados tras 3 dosis de WIN55.212-2. Cada determinación se repitió tres veces con PAG procedente de grupos independientes de 8 animales. Cada valor es la media±ESM.

2. El módulo HINT1-RGSZ2 en la asociación entre GPCRs-NMDAR

2.1. La proteína HINT1 existe como un homodímero en la célula

En sinaptosomas de tejido cerebral murino, la proteína HINT1 se detectó en 14 y 28 kDa, correspondiendo el primer peso al monómero y el segundo a un posible homodímero. Varios estudios *in vitro* demuestran la existencia de HINT1 en forma de homodímero (Pearson y col., 1990; Lima y col., 1996; Klein y col., 1998), sin embargo, todavía no se había observado la existencia del dímero *in vivo*.

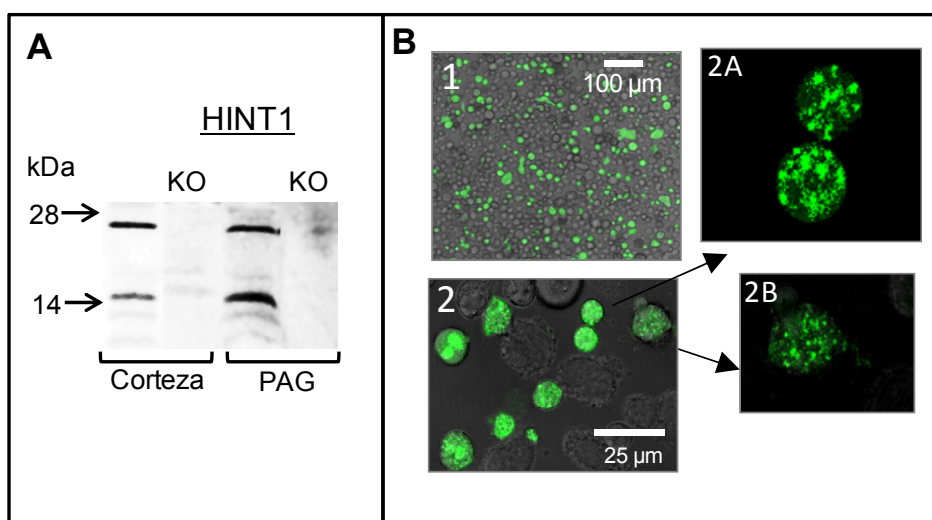


Figura 34. La proteína HINT1 forma un homodímero *in vivo*. (A) Inmunodetección de HINT1 en una preparación enriquecida en sinaptosomas obtenida de corteza cerebral y PAG procedente de 6 ratones 129/SvJ WT y KO para HINT1. Se indican tanto el monómero (14 KDa) como el dímero (28 KDa) de HINT1. (B) Visualización de la formación del homodímero de HINT1 mediante BiFC en células CHO co-transfectadas con el ADNc codificante para HINT1^{VC155} y HINT1^{VN173} en proporción 1:1. En el panel B se muestran imágenes combinadas de contraste de fase y fluorescencia (1 y 2), tomadas con objetivos de 20 X y 63 X, respectivamente; las imágenes de fluorescencia 2A y 2B son detalles de la imagen 2.

La existencia de HINT1 como homodímero de 28 KDa se apoya en la ausencia de ambas bandas en tejido cerebral de ratones 129/SvJ KO para HINT1 (figura 34A), y en ensayos de complementación bimolecular por fluorescencia. Se co-transfectaron células CHO con una mezcla 1:1 de HINT1 fusionada en su extremo C-terminal con los fragmentos de la proteína Venus VC155 y VN173. La complementación de ambos fragmentos tras la interacción de las proteínas en estudio genera un complejo fluorescente

estable que fue evidente en numerosas células, indicando la formación del homodímero de HINT1 *in vivo* (figura 34B).

2.1.1. El homodímero de HINT1 interacciona directamente con RGSZ2

La proteína HINT1 funciona como nexo de unión entre RGSZ1 y el extremo C-terminal de MOR (Ajit y col., 2007), lo que explica la coprecipitación de MOR y RGSZ1 observada en análisis *ex vivo* de tejido cerebral de ratón (Garzón y col., 2005c; Garzón y col., 2005d). Apoyándonos en los resultados descritos en el apartado anterior y teniendo en cuenta el papel de HINT1 como mediadora en la modulación entre MOR y RGSZ1, se estudió si HINT1 se asociaba también con la RGSZ2. Los estudios de SPR y BiFC confirmaron la presencia de una interacción directa entre HINT1 y RGSZ2 (figura 35A y 35B).

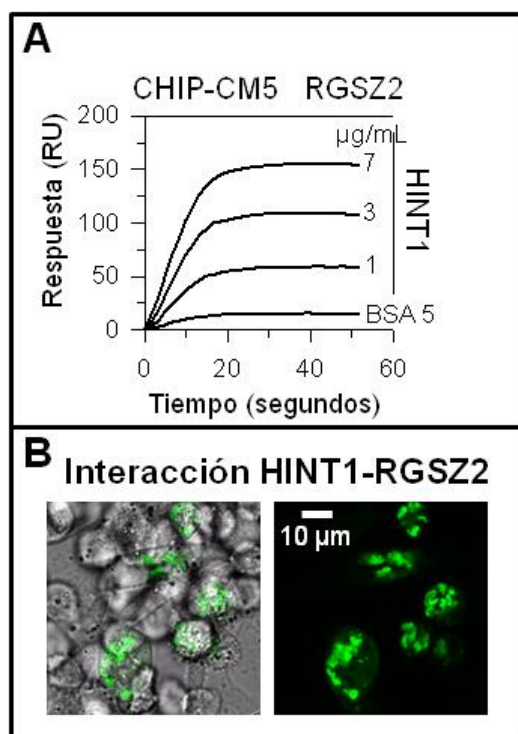


Figura 35. RGSZ2 se asocia con la proteína HINT1. (A) SPR. La proteína recombinante RGSZ2 se acopló a un chip sensor CM5; los sensogramas (recogidos a 25 °C y una velocidad de flujo de 5 µl/min) corresponden al paso de 75 µl de soluciones de HINT1 en concentraciones crecientes de 1 a 7 µg/ml. El paso de una solución de BSA 5 µg/ml no dio señal con la RGSZ2. (B) BiFC de RGSZ2 y HINT1 tras la co-transfección transitoria de células CHO con los ADNc codificantes para HINT1^{VN173} y RGSZ2^{VC155}. A la izquierda, imagen combinada de contraste de fase y fluorescencia; a la derecha, imagen de fluorescencia. Objetivo 63 X, zoom 3,5.

Posteriormente, consideramos la posibilidad de que la presencia de subunidades *GazGTP* o *Gai2GTP* unidas a RGSZ2 pudiera interferir en la asociación entre HINT1 y RGSZ2. Para comprobarlo, se analizó en primer lugar la existencia de una interacción directa entre las proteínas recombinantes HINT1 y *Gai2/z* (figura 36). La subunidades

Gai2/z (100 nM) se co-incubaron con HINT1 (200 nM). El *tag* de GST de las proteínas recombinantes Gai2 y HINT1 se había cortado previamente con la proteasa TEV. La proteína HINT1 se inmunoprecipitó (IP) con un anticuerpo biotinado anti-HINT1 y, tras la adición de estreptavidina agarosa, los inmunocomplejos formados se separaron de la mezcla por filtración y se solubilizaron con el tampón *Laemmli* 2 X calentado a 100 °C para ser estudiados por *western blot* (WB). Como se muestra en la figura 36, no se observó interacción directa entre las subunidades Gα y el homodímero de HINT1.

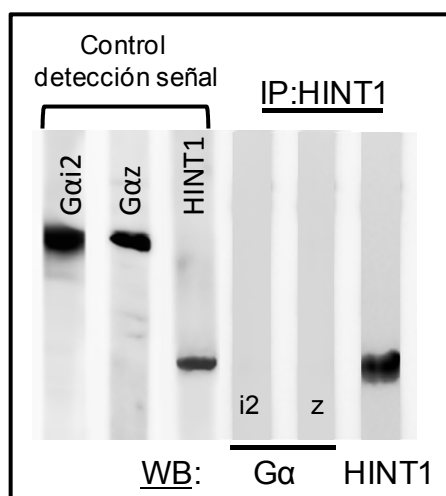


Figura 36. Las subunidades Gai2/z no se asocian con HINT1. En la imagen, las tres primeras calles se corresponden con la cantidad de subunidades Gα y HINT1 utilizadas en el ensayo. Las calles cuarta y quinta se corresponden respectivamente con las subunidades Gai2 y Gaz asociadas a HINT1 mientras que en la última calle se ve la cantidad de HINT1 inmunoprecipitada.

Una vez descartada la asociación directa HINT1-Gα, se realizó el ensayo de interacción *in vitro* entre la proteína HINT1 y la RGSZ2 pre-acoplada a subunidades Gai2 o Gaz activadas. Las subunidades Gai2/z se incubaron en presencia de 10 μM GTPγS en tampón HBS-EP durante 30 minutos. El exceso de GTPγS se eliminó mediante filtración. Posteriormente, la proteína RGSZ2 se incubó con las Gai2/z activadas en proporción 1:1, para después añadir la proteína HINT1 (200 nM). Las subunidades Gai2 y Gaz se inmunoprecipitaron utilizando dos anticuerpos biotinados dirigidos frente al dominio helicoidal de las Gα, que no está implicado en la interacción con la RGSZ2, y la RGSZ2 se inmunoprecipitó con un anticuerpo biotinado anti-RGSZ2. La cantidad de proteína HINT1 asociada al complejo RGSZ2-Gai2/z se analizó mediante *western blot* con un anticuerpo específico de HINT1. La interacción de HINT1 con RGSZ2-Gai2/z resultó positiva, indicando que el complejo RGSZ2-Gai2/z se une directamente al homodímero de HINT1 (figura 37). Por tanto, la presencia de subunidades GazGTP o Gai2GTP unidas a RGSZ2 no interfiere en la interacción entre HINT1 y RGSZ2.

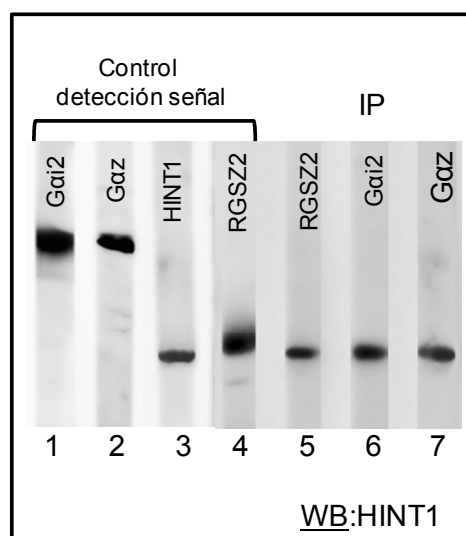


Figura 37. El complejo RGSZ2-Gai2/z se asocia con el homodímero de HINT1. (A) Calle 1, 2, 3, 4: cantidad de Gai2, Gaz, HINT1 y RGSZ2 empleadas en el ensayo; calle 5, 6 y 7: HINT1 asociada al complejo RGSZ2-Gai2/z. IP: inmunoprecipitación; WB: *western-blot*.

2.1.2. Papel de la PKC en la interacción entre HINT1 y RGSZ2

Como la morfina recluta la serina-treonina quinasa PKC γ al módulo HINT1-RGSZ2 (Rodríguez-Muñoz y col., 2008), se consideró la posibilidad de que la PKC γ pudiera estar implicada en la ruptura de este complejo. De esta forma, se analizó la influencia de concentraciones crecientes de PKC γ en la asociación HINT1-RGSZ2.

La proteína GST-RGSZ2 (100 nM) se incubó junto con HINT1 (200 nM) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras lo cual, se añadió a la mezcla de incubación concentraciones crecientes de PKC γ (30, 60, 90 nM y 0,3 μ M) en 100 μ l de tampón quinasa (NaHEPES 60 mM pH 7,5, MgCl₂ 3 mM, MnCl₂ 3 mM, ortovanadato sódico 3 μ M, DTT 1 mM y ATP 250 μ M). Pasados 20 minutos, la reacción se terminó añadiendo a la mezcla una concentración 5 μ M del inhibidor de PKC Gö7874. La RGSZ2 se precipitó con glutatión agarosa y se evaluó la cantidad de HINT1 que venía asociada con ella. Estos resultados se compararon con la asociación RGSZ2-HINT1 en ausencia de PKC γ . Se observó que la actividad de la PKC γ sola produjo una separación limitada entre los componentes del complejo, incluso trabajando con un exceso de PKC en relación al módulo HINT1-RGSZ2 (figura 38).

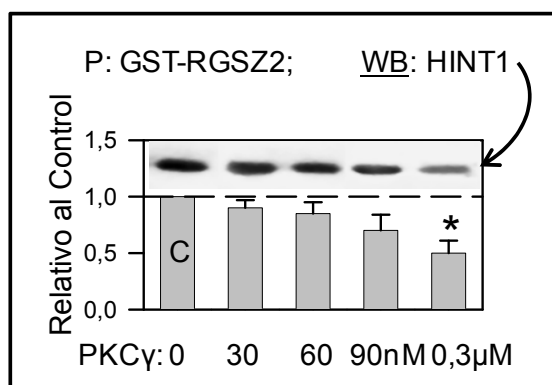


Figura 38. La PKC γ produce una disociación limitada del complejo HINT1-RGSZ2. Las señales inmunodetectadas (densidad óptica media de los píxeles dentro del área estudiada/mm²) se expresan en función de la cantidad de HINT1 que precipitó con la GST-RGSZ2 en situación control, sin PKC γ , a la que se ha dado un valor arbitrario de 1. Cada valor es la media \pm ESM de dos ensayos independientes. * Estadísticamente significativo respecto al grupo control. ANOVA-Student-Newman-Keuls test; $p < 0,05$. P: precipitado con glutatión agarosa; WB: *western-blot*.

A continuación, nos planteamos si la presencia de subunidades G α activadas pudiera ser de importancia en la disociación del módulo HINT1-RGSZ2 por PKC γ , por lo que se ensayó la influencia de 30 nM de PKC γ en la asociación HINT1-RGSZ2, añadiendo al medio de incubación subunidades Gai2/z unidas a GTP γ S. Estos resultados se compararon con la asociación RGSZ2-HINT1 en ausencia de PKC γ y G α GTP γ S, y en presencia de G α GDP.

Las subunidades Gai2/z (50, 100, 150 nM cada una) se incubaron en presencia de 10 μ M GTP γ S en tampón HBS-EP durante 30 minutos. El exceso de GTP γ S se eliminó mediante filtración. Posteriormente, la proteína RGSZ2 se incubó con las Gai2/z activadas, para después añadir la proteína HINT1 (200 nM). Pasados 15 minutos, se añadió a la mezcla PKC γ 30 nM en 100 μ l de tampón quinasa y se prolongó la incubación 20 minutos más. La GST-RGSZ2 unida a glutatión agarosa se precipitó por centrifugación y la HINT1 asociada se analizó por *western blot*.

La presencia de subunidades G α activadas (Gai2GTP γ S y GazGTP γ S) hizo que concentraciones de PKC γ antes ineficientes pudieran segregar el complejo RGSZ2-HINT1. Sin embargo, la presencia de PKC γ 30 nM junto con 150 nM de las subunidades Gai2/z-GDP no produjo una disgregación significativa del complejo (figura 39). Gai2GTP γ S y GazGTP γ S por sí solas tampoco produjeron una disociación significativa entre HINT1 y RGSZ2.

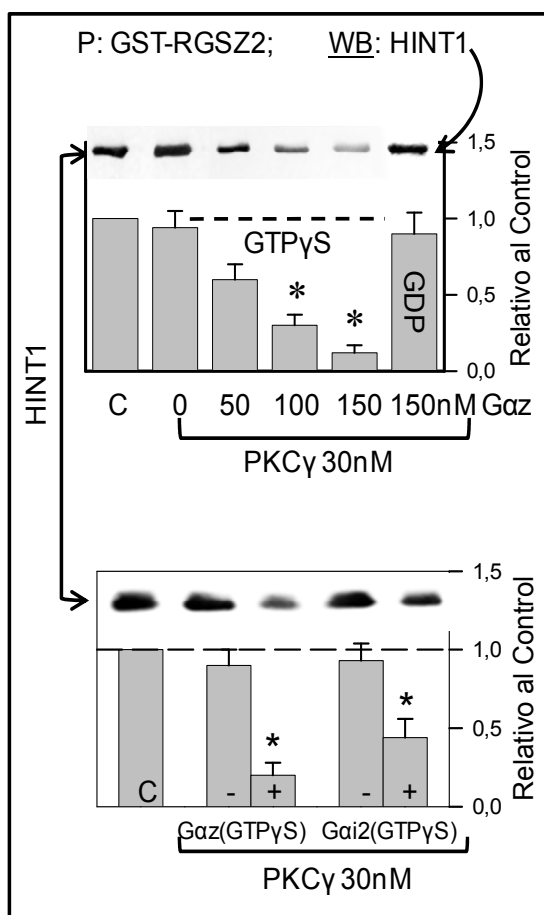


Figura 39. En presencia de subunidades *Gai2/zGTPγS*, una concentración subefectiva de *PKCγ* (30 nM) produce la disgregación del complejo *RGSZ2-HINT1*. En el panel superior se muestra el efecto de la *PKCγ* en la estabilidad del complejo *GST-RGSZ2-HINT1* en presencia de concentraciones crecientes de subunidades *GazGTPγS* o de una concentración elevada de *GazGDP*. En el panel inferior se compara el efecto de la *PKCγ* en la dinámica de la asociación *GST-RGSZ2-HINT1* en presencia o no de subunidades *Gai2/zGTPγS* a una concentración de 100 nM. Las señales inmunodetectadas (densidad óptica media de los píxeles dentro del área estudiada/mm²) se expresan en función de la cantidad de *HINT1* que precipitó con la *GST-RGSZ2* en situación control, sin *PKCγ* ni *Gai2/z* activadas, a la que se ha dado un valor arbitrario de 1. Cada valor es la media±ESM de dos ensayos independientes. * Estadísticamente significativo respecto al grupo control. ANOVA-Student-Newman-Keuls test; $p < 0,05$. P: precipitado con glutatión agarosa, WB: western-blot.

2.2. Interacción del extremo C-terminal de MOR con el módulo *HINT1-RGSZ2*

Varios estudios han descrito la asociación de una serie de proteínas de señalización con el extremo C-terminal de MOR; entre ellas se encuentran la proteína *HINT1* (Ajit y col., 2007) y proteínas *RGS* de la subfamilia *RZ* (Garzón y col., 2004; Garzón y col., 2005c; Garzón y col., 2005d). Nuestros estudios han resuelto que estas proteínas participan en la potenciación de la función del NMDAR inducida por el MOR. Para entender mejor la importancia de la interacción MOR-NMDAR, se estudió cómo se ensamblan estas proteínas en el extremo C-terminal del MOR y el tipo de interacción que tiene lugar entre ellas.

2.2.1. Interacción física directa del extremo C-terminal del MOR con HINT1

Se ha estudiado la interacción entre la proteína HINT1 y los extremos citosólicos de MOR1 y MOR1C mediante un ensayo de interacción *in vitro* en el que se co-incubó la proteína recombinante HINT1 sin GST (200 nM) con 100 nM de GST-MOR1_{CT} (A₂₈₇-P₃₉₈) o GST-MOR1C_{CT} (F₃₃₈-R₄₃₈). El GST-MOR1/1C se precipitó con glutatión agarosa y el homodímero de HINT1 asociado se evaluó por *western blot*, utilizando anticuerpos frente a HINT1 y GST. Como se muestra en la figura 40, el homodímero de HINT1 interaccionó con los extremos citosólicos de ambos receptores, MOR1 y MOR1C.

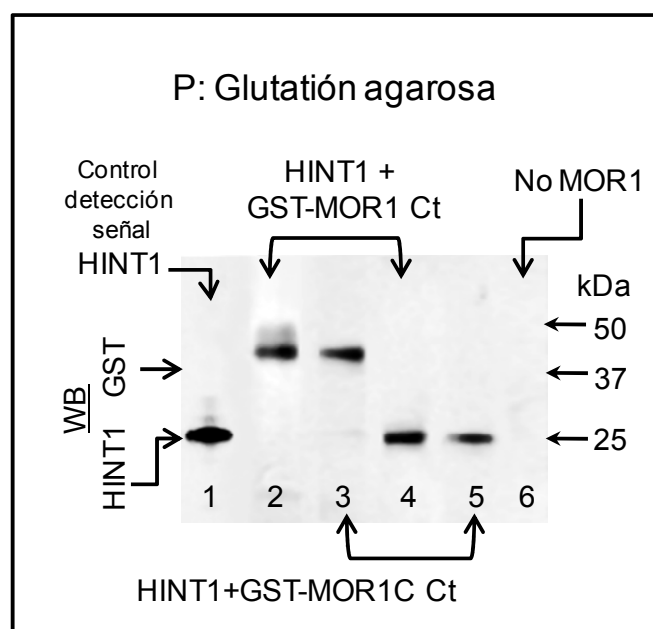


Figura 40. MOR1_{CT} interacciona físicamente con el homodímero de HINT1. La primera calle corresponde a la cantidad de proteína HINT1 utilizada para el ensayo de interacción, en las calles 2 y 4 se muestra la interacción entre el homodímero de HINT1 y el extremo C-terminal del MOR1_{CT} revelando con anticuerpos anti-GST y anti-HINT1 respectivamente; en las calles 3 y 5 la interacción HINT1-MOR1C_{CT} revelando con anticuerpos anti-GST y anti-HINT1 respectivamente; finalmente, en la calle 6, el control negativo de interacción entre GST recombinante y HINT1 revelado con el anticuerpo anti-HINT1. P: precipitado con glutatión agarosa; WB: *western-blot*.

El sensograma representado en la figura 41 indica que HINT1 a concentraciones entre 0,3-5 $\mu\text{g/ml}$ es capaz de interaccionar con el extremo C-terminal del MOR1, inmovilizado por su N-terminal en un chip sensor CM5. El ensayo de coprecipitación *in vitro* (figura 40) junto con el análisis de interacción por resonancia de plasmón superficial (figura 41) confirman la asociación MOR1_{CT}-HINT1.

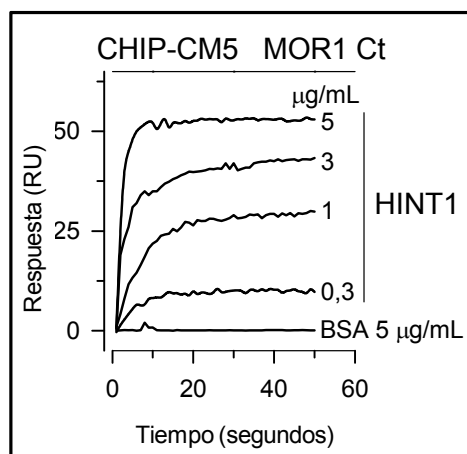


Figura 41. Asociación directa del extremo C-terminal del MOR1 con la proteína HINT1 mediante SPR. Sensogramas de resonancia de plasmón superficial correspondientes a la interacción entre concentraciones de HINT1 de 0,3-5 µg/ml en solución y MOR1_{CT}, acoplado al segundo canal de un chip CM5. El paso de una solución de 5 µg/ml de BSA sobre el chip de MOR1_{CT} no dio señal alguna.

Para confirmar los resultados obtenidos y determinar si MOR1 es capaz de interactuar con HINT1 en células vivas, se realizó un experimento de BiFC. La co-transfección de los plásmidos HINT1^{VC155} y MOR1^{VN173} en células CHO, seguido de la observación por microscopía confocal tras 24 horas de incubación, resultó en la reconstitución de la proteína Venus; lo que demuestra la interacción directa entre HINT1 y MOR1 *in vivo* (figura 42).

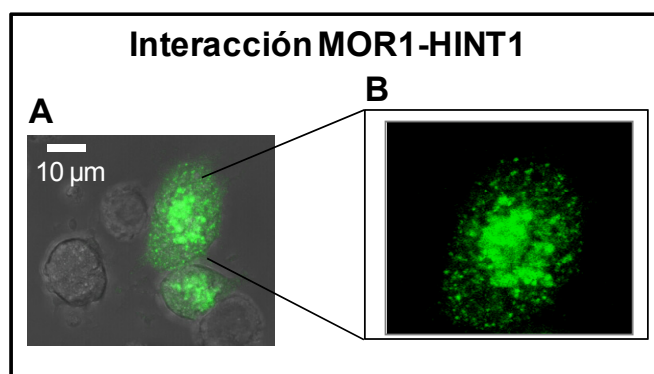


Figura 42. MOR1 interactúa físicamente con el homodímero de HINT1 *in vivo*. Visualización de la interacción de MOR1 con HINT1 mediante BiFC, con células CHO co-transfectadas con el ADNc codificante para HINT1^{VC155} y MOR1^{VN173} en proporción 1:1 (0,5 µg). A, imagen de contraste de fase y fluorescencia, objetivo 63 X, zoom 1,8; B, imagen de fluorescencia, detalle de la imagen A.

2.2.2. RGSZ2 no se une directamente a la región C-terminal del MOR

Estudios previos muestran que el MOR coprecipita con RGSZ2 (Garzón y col., 2005c). Para analizar con mayor detalle la posible asociación entre el MOR y la proteína reguladora RGSZ2, se llevaron a cabo ensayos de interacción *in vitro* en los que la proteína recombinante RGSZ2 (100 nM) se co-incubó con 100 nM de GST-MOR1_{CT}. La

proteína GST-MOR1_{CT} se precipitó (P) con glutatión agarosa y se analizó la RGSZ2 asociada mediante *western blot* (WB). La proteína RGSZ2 recombinante no coprecipitó con el extremo C-terminal de MOR1 (figura 43), lo que indica que la asociación entre ambas proteínas no es directa.

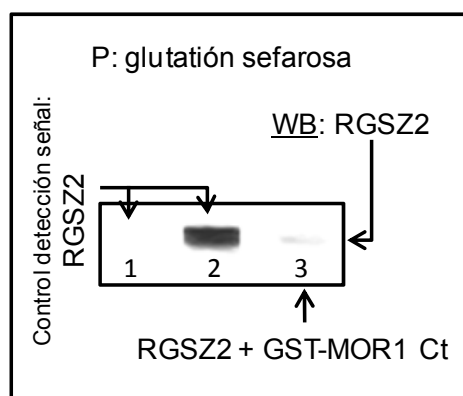


Figura 43. RGSZ2 y MOR1_{CT} no interaccionan directamente. La primera calle corresponde a la cantidad de RGSZ2 utilizada en el ensayo, revelada con un anticuerpo anti-RGSZ2_{CT}, previamente pre-incubado con 0,05 mg de péptido antigénico. La segunda calle corresponde a la cantidad de RGSZ2 utilizada en el ensayo, revelada con el anticuerpo frente a la región C-terminal de la RGSZ2. La tercera calle corresponde al ensayo de interacción entre GST-MOR1_{CT} y RGSZ2.

En concordancia con el anterior resultado, en los análisis por SPR no se detectó interacción alguna entre el extremo carboxilo terminal del MOR1, inmovilizado en un chip sensor CM5, y la proteína RGSZ2 (figura 44). Tampoco se observó emisión de señal fluorescente tras la expresión en células CHO de las proteínas MOR1 y RGSZ2, fusionadas respectivamente a los fragmentos VC155 y VN173.

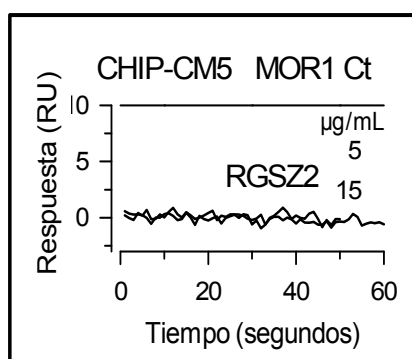


Figura 44. Ausencia de interacción directa entre MOR1_{CT} y RGSZ2 por SPR. La región C-terminal del receptor MOR1 se acopló a un chip sensor CM5. Los sensogramas se recogieron a 25 °C y a una velocidad de flujo de 5 µl/min; se pasaron 75 µl de una solución con RGSZ2 a una concentración de 5 y 15 µg/ml sobre la superficie del chip.

2.2.3. Estabilidad de la asociación del MOR con el módulo HINT1-RGSZ2

Se administró a los animales una dosis de 10 nmol/ratón de morfina vía icv y 24 horas más tarde una dosis de 1 nmol/ratón del inhibidor de PKC, Gö7874, o del antagonista del NMDAR, MK-801. Media hora después de esta última administración, los

ratones se sacrificaron y el MOR presente en las membranas sinaptosomales del PAG se inmunoprecipitó utilizando un anticuerpo dirigido frente al segundo bucle extracelular del receptor. Los complejos proteicos inmunoprecipitados se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a un soporte sólido (*blot*) para el análisis de la asociación de HINT1 y RGSZ2 con el MOR tras los tratamientos realizados. Como cabía esperar, el análisis *ex vivo* de membranas sinaptosomales de PAG no mostró una disminución de la presencia del MOR en superficie tras la administración de morfina. Por otra parte, el MOR anclado a la membrana permaneció asociado con HINT1 y los tratamientos con Gö7874 o con MK-801 casi no modificaron dicha asociación (figura 45).



Figura 45. Efecto de la morfina en la estabilidad de la asociación MOR-HINT1. Las membranas sinaptosomales de PAG se obtuvieron de grupos independientes de 8 ratones. El grupo control de ratones no se trató. El resto de los animales recibieron una dosis de 10 nmol/ratón de morfina *via icv*. A las 24 horas post-inyección, se les administró 1 nmol/ratón de Gö7874 o de MK-801. Después de 30 minutos se sacrificaron y el MOR presente en las membranas sinaptosomales de PAG se inmunoprecipitó (IP) con IgGs biotinadas dirigidas frente al segundo bucle extracelular del receptor. La inmunodetección se realizó con un anticuerpo específico anti-HINT1. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Sin embargo, la administración de morfina sí disminuyó la interacción entre MOR y RGSZ2. La asociación entre estas proteínas se recuperó tras el tratamiento con Gö7874 o MK-801, siendo este último algo más efectivo que el primero (figura 46).

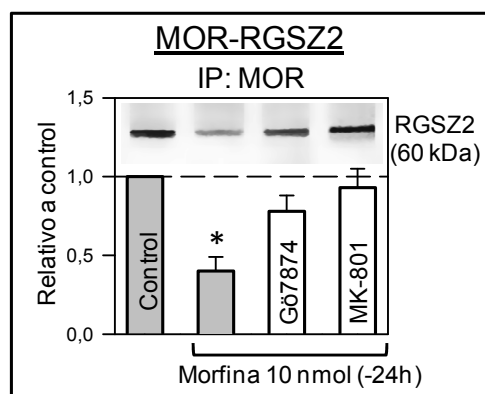


Figura 46. Efecto de la morfina en la estabilidad de la asociación MOR-RGSZ2. Las membranas sinaptosomales de PAG se obtuvieron de grupos independientes de 8 ratones. El grupo control de ratones no recibió morfina. La inmunodetección se realizó con un anticuerpo dirigido frente al extremo C-terminal de la RGSZ2. Los ensayos se realizaron por triplicado. Cada valor es la media±ESM de tres ensayos independientes. * Estadísticamente significativo respecto al grupo control, ANOVA-Student-Newman-Keuls test; $p < 0,05$. IP: inmunoprecipitación.

2.3. Interacción del extremo C-terminal del CB1R con el módulo de señalización HINT1-RGSZ2

La Gaz es importante en la señalización mediada por CB1R, y la familia de las RGS-RZ es su principal regulador. Con estos antecedentes, se analizó si este receptor cannabinoide podía estar asociado con el módulo de señalización HINT1-RGSZ2.

Se solubilizó PAG control de ratón y se realizó la inmunoprecipitación (IP) de los receptores MOR y CB1R. Mediante *western-blot* (WB) se analizaron las proteínas del módulo que venían asociadas a ambos receptores. Tanto MOR como CB1R coprecipitaron con HINT1, RGSZ1 y RGSZ2; estas dos últimas proteínas se detectaron a su peso molecular teórico, que en el caso de la RGSZ1 es de 27 KDa y de 25 KDa para la RGSZ2; si bien, en ambos casos, los anticuerpos específicos detectaron también señales de peso molecular mayor al esperado como consecuencia de la fosforilación, glicosilación y sumoilación de estas proteínas en distintas posiciones (Rodríguez-Muñoz y col., 2007a). El módulo HINT1/RGSZ no se asocia a todos los GPCRs, el DOR, receptor opioide que no regula las proteínas Gaz en cerebro (Sánchez-Blázquez y col., 1995) apareció débilmente asociado a la RGSZ2 (figura 47).

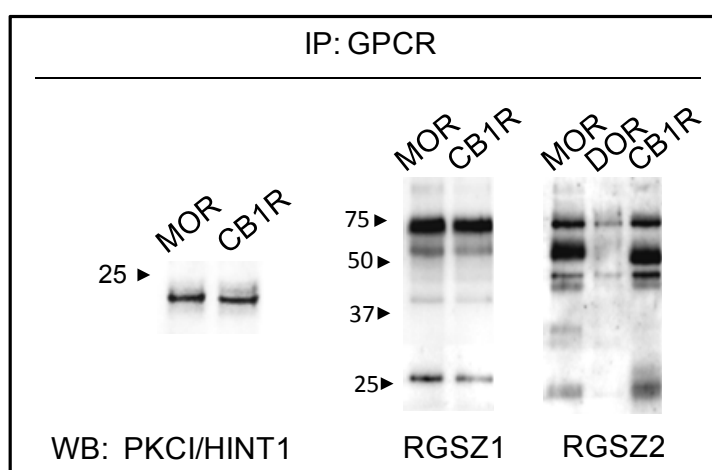


Figura 47. Asociación del módulo HINT1/RGSZ con MOR y CB1R en PAG de ratón. Las membranas sinaptosomales de PAG procedentes de grupos independientes de 8 ratones se solubilizaron en Tris/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente a MOR, CB1R y DOR. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente a la HINT1, RGSZ1 y RGSZ2. Los ensayos se realizaron por triplicado.

La asociación entre CB1R y el módulo HINT1/RGSZ2 se estudió también mediante SPR. En ambos casos, se utilizó un chip sensor CM5 en el que se acopló el extremo carboxilo terminal del CB1R sin GST. Sobre la superficie del sensor, se pasaron 75 μ l de una solución acuosa con concentraciones crecientes de HINT1 o RGSZ2 a un flujo constante de 5 μ l/min. La interacción resultó positiva tanto para CB1R-HINT1 como para CB1R-RGSZ2 (figura 48A y 48B).

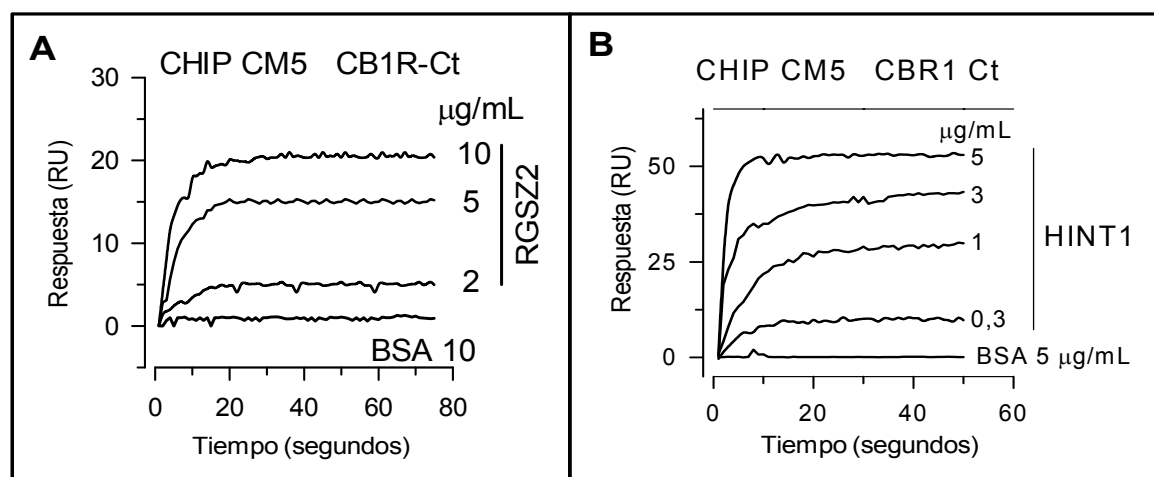


Figura 48. Interacción física directa de CB1R con los componentes del módulo HINT1/RGSZ2 mediante SPR. Diferentes concentraciones de las proteínas HINT1 (0,3, 1, 3 y 5 μ g/ml) o RGSZ2 (2, 5, 10 μ g/ml) en solución se pasaron sobre un chip CM5 en el que se había acoplado el extremo C-terminal del receptor CB1. Los sensogramas se recogieron a 25 $^{\circ}$ C y una velocidad de flujo de 5 μ l/min. El paso de una solución de 5 μ g/ml de BSA sobre el chip de CB1R_{CT} no dio señal alguna.

Para determinar si el receptor CB1 interactúa con HINT1 y RGSZ2 *in vivo*, se llevaron a cabo ensayos de complementación bimolecular por fluorescencia. Se co-transfectaron células CHO con una mezcla 1:1 de plásmidos que codificaban para el receptor CB1 (fusionado en su extremo C-terminal con el fragmento VC155 de la proteína Venus) y para HINT1 o RGSZ2 (fusionados en su N-terminal con el fragmento complementario de la proteína fluorescente, VN173). El análisis por BiFC confirmó la existencia de una interacción directa entre el CB1R y los componentes del módulo HINT1-RGSZ2 en células vivas (figura 49).

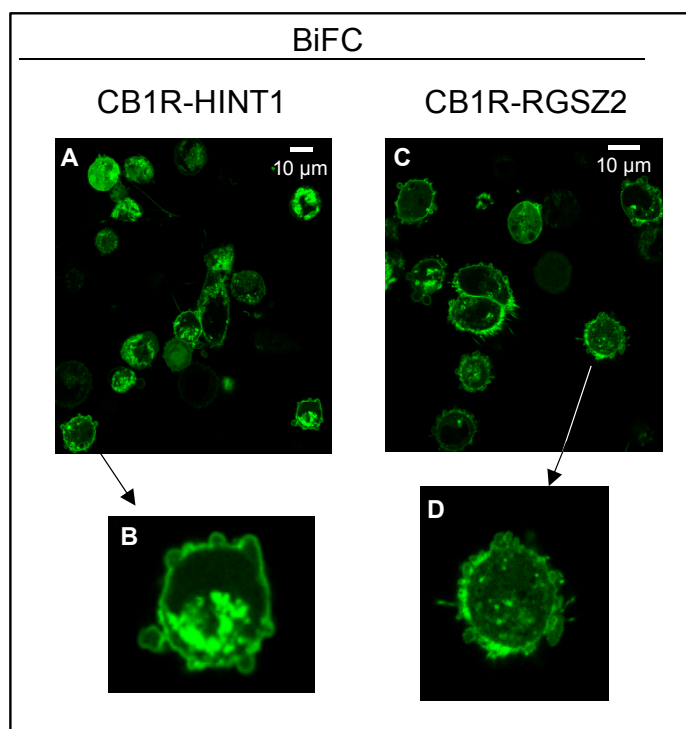


Figura 49. CB1R interacta con HINT1 y RGSZ2 *in vivo*. Visualización de la interacción de CB1R con HINT1 (izquierda) y CB1R con RGSZ2 (derecha) mediante BiFC en células CHO co-transfectadas con los ADNc codificantes para CB1R^{VC155} y HINT1^{VN173} o RGSZ2^{VN173} en proporción 1:1 (0,4 µg). Las imágenes A y C están tomadas con un objetivo de 63 X y zoom 2 (A) y 2,25 (C). Las imágenes B y D son detalles de las imágenes A y C, respectivamente.

2.3.1. Estabilidad de la asociación del CB1R con el módulo HINT1-RGSZ2

Una dosis de WIN55.212-2 administrada vía icv es suficiente para estimular la internalización del CB1R en neuronas de PAG (apartado 1.2.1.1, figura 28). Como el receptor cannabinoide se encuentra asociado con HINT1 y RGSZ2 en membranas sinaptosomales de esta estructura, se consideró interesante estudiar el efecto del WIN55.212-2 en la dinámica de asociación del CB1R con estas proteínas, así como con subunidades Gaz cuya activación es esencial en la respuesta antinociceptiva supraespinal mediada por este agonista.

Los ratones recibieron 20 nmol/ratón de WIN55.212-2 vía icv, se sacrificaron en varios intervalos post-administración y se extrajo su PAG. El receptor CB1 presente en la fracción soluble de sinaptosomas (S2) se inmunoprecipitó utilizando IgGs biotinadas dirigidas al primer bucle extracelular del receptor. El estudio de la coprecipitación del receptor con diferentes proteínas de la cascada de señalización mostró un aumento de su interacción con GRK2 y β -arrestina 2. Los CB1R internalizados no estaban asociados con subunidades Gaz, lo que sugiere que el receptor cannabinoide activado por WIN55.212-2 se desacopla de las proteínas Gz y se internaliza en respuesta a la fosforilación por GRKs

y posterior unión de β -arrestinas, como se había descrito en estudios previos de otros grupos (Jin y col., 1999; Rubino y col., 2006). Sin embargo, el receptor endocitado sí coprecipitó con HINT1 desde los 10 minutos posteriores a la administración de WIN55.212-2, con un máximo a los 30 minutos post-inyección. La asociación de CB1R con la RGSZ2 en citosol también aumentó durante el período en el que el WIN55.212-2 ejerce su actividad analgésica, disminuyendo progresivamente a partir de los 60 minutos de la administración. La RGSZ2 mostró un patrón de bandas en escalera como resultado de sus modificaciones post-transduccionales (Rodríguez-Muñoz y col., 2007a).

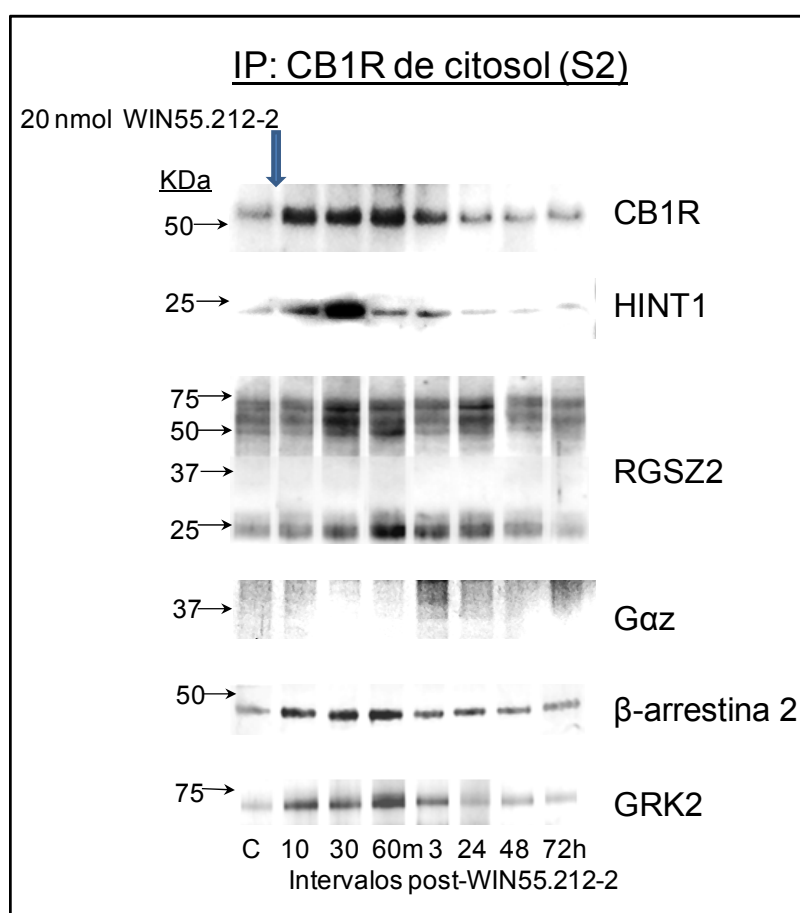


Figura 50. El CB1R coprecipita con HINT1 y RGSZ2 en citosol de neuronas de PAG de ratón tras su activación con WIN55.212-2. Los ratones recibieron una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2 vía icv y se sacrificaron a los intervalos indicados. Para cada intervalo estudiado, se preparó la fracción citosólica S2 del PAG correspondiente a grupos independientes de 6 ratones donde se inmunoprecipitó (IP) al CB1R con IgGs biotinadas dirigidas frente al primer bucle extracelular del receptor. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La inmunodetección se realizó con anticuerpos específicos frente al CB1R, la HINT1, la RGSZ2, la subunidad Gaz, la β -arrestina 2 y la quinasa GRK2. Los ensayos se repitieron tres veces y los resultados fueron comparables.

2.3.2. HINT1 participa en la conexión molecular entre CB1R y NMDAR

Como se ha descrito anteriormente, la administración icv de 3 dosis consecutivas de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2 disminuye significativamente los niveles de CB1R en membrana, sin embargo, una inyección icv de 1 nmol/ratón de MK-801 media hora antes del tratamiento con WIN55.212-2 es capaz de bloquear esta internalización (apartado 1.2.1.3, figura 32).

En este punto, se analizó lo que ocurre en los animales KO para HINT1. Los animales se sacrificaron después de la administración de 3 dosis de WIN55.212-2 o de MK-801+ 3 dosis de WIN55.212-2. Se inmunoprecipitó el CB1R en la fracción de membrana P2 y en la citosólica S2 del PAG de los ratones sin HINT. En estos animales se observó una disminución de la presencia del CB1R en superficie después de la administración repetida del agonista cannabinoide, que se correspondió con un aumento del receptor en la fracción citosólica S2 de PAG. No obstante, a diferencia de lo observado en ratones control, el tratamiento con MK-801 no bloqueó la internalización del CB1R (figura 51).

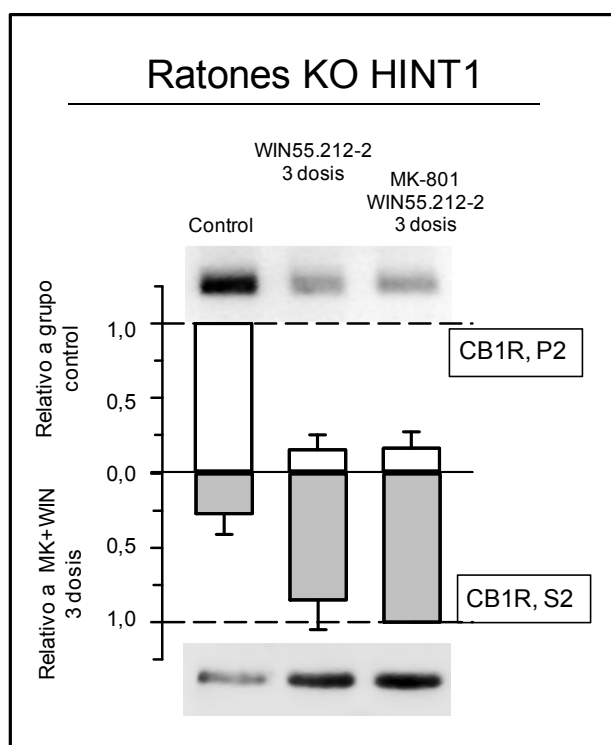


Figura 51. El bloqueo del NMDAR por MK-801 no reduce la internalización del CB1R en ratones KO para HINT1. Se prepararon las membranas sinaptosomales y la fracción citosólica S2 del PAG correspondiente a grupos independientes de 6 ratones. Se realizó la inmunoprecipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente a CB1R. Las señales inmunodetectadas a nivel de membrana (densidad óptica media de los píxeles dentro del área estudiada/mm²) se expresan en función de los niveles de CB1R observados en los ratones control, sin tratamiento, a los que se ha dado un valor arbitrario de 1; a nivel de citosol, se expresan en función de los niveles de CB1R detectados tras la administración de MK-801+3 dosis WIN55.212-2. Los ensayos se realizaron por triplicado. Cada valor es la media±ESM.

3. Asociación del NMDAR con proteínas del entorno de los GPCRs: HINT1 y RGSZ2

Con el fin de conocer si la asociación de HINT1 con el NMDAR y de RGSZ2 con el NMDAR es directa o indirecta, se analizó la interacción en tiempo real entre las proteínas recombinantes HINT1 y RGSZ2 y la proteína recombinante NR1 C0/C1/C2_{CT}, inmovilizada por su N-terminal en el segundo canal de un chip sensor CM5. Para ello, se inyectaron HINT1 o RGSZ2 disueltas en 75 μ l del tampón HBS-EP en concentraciones crecientes, a un flujo de 5 μ l/min. También se estudiaron las interacciones inespecíficas entre HINT1, RGSZ2 y la superficie de dextrano del primer canal del chip, que no contenía la NR1 C0/C1/C2_{CT} pero que se había procesado del mismo modo que el canal en el que habíamos inmovilizado el extremo carboxilo de la subunidad del NMDAR. Mediante este estudio de SPR, se detectó la interacción física directa de la proteína HINT1 con la NR1 C0/C1/C2_{CT}; sin embargo, RGSZ2 no interaccionó directamente con la subunidad del NMDAR (figura 52).

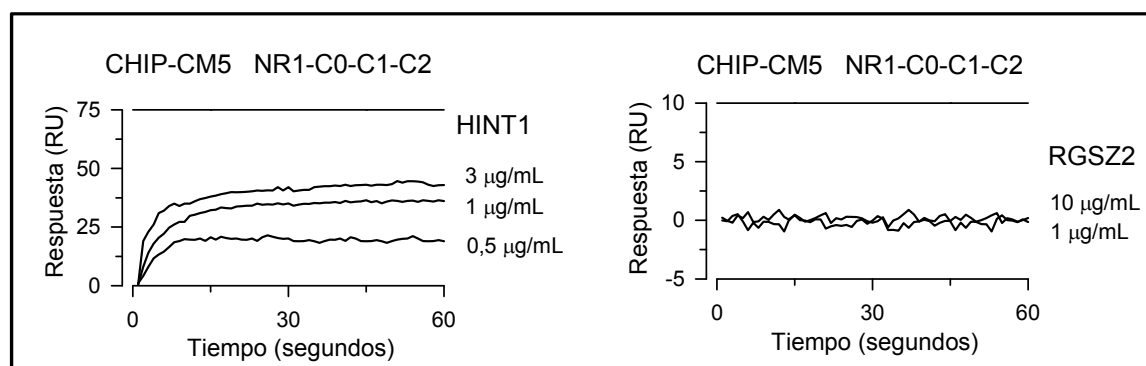


Figura 52. Interacción física directa de los componentes del módulo HINT1/RGSZ2 con NMDAR mediante SPR. Diferentes concentraciones de las proteínas HINT1 (0,5, 1, y 3 μ g/ml) o RGSZ2 (1 y 10 μ g/ml) en solución, se pasaron sobre un chip CM5 en el que se había acoplado el extremo C-terminal de la subunidad NR1 C0/C1/C2 del NMDAR. Los sensogramas se recogieron a 25 °C y una velocidad de flujo de 5 μ l/min.

4. Estudio conductual en el ratón

Los ratones empleados en los estudios de inmunoprecipitación, CD1 y WT/KO para HINT1, se han caracterizado a nivel funcional, evaluando su actividad motora

espontánea así como su respuesta analgésica y la producción de tolerancia antinociceptiva ante opiáceos (Rodríguez-Muñoz y col., 2007b; Rodríguez-Muñoz y col., 2007c). Esta parte del trabajo se centra en la caracterización de los efectos del agonista cannabinoide WIN55.212-2 en las dos cepas de ratones utilizadas, CD1 y 129/SvJ (WT/KO para HINT1).

4.1. Actividad motora espontánea

Los ratones CD1 y WT/KO para HINT1 se monitorizaron de forma individual para estudiar su actividad motora espontánea. Para ello, los animales se introdujeron durante 90 minutos en las cajas de registro *VersaMax* (*AccuScan Instruments Inc.*). Los cuadros de haces de luz infrarroja situados alrededor de las cajas permitieron controlar la actividad motora de los animales sin interferencias externas. La interrupción de los haces de luz se contabilizó como una unidad de movimiento. Finalmente, los movimientos acumulados en intervalos de 15 minutos se almacenaron y procesaron con el software *VersaMax* y *VersaDat* (*AccuScan Instruments Inc.*).

En la figura 53 se presentan los datos obtenidos para los animales KO para HINT1 y para los correspondientes WT. Los parámetros analizados fueron: el número de movimientos, la distancia recorrida (en centímetros), la actividad horizontal, la actividad vertical, el tiempo en el centro (en segundos) y la velocidad (en centímetros/segundo). No se encontraron grandes diferencias entre ambos genotipos. Si bien, se observó que los ratones KO presentaban una menor habituación ya que, aunque el número total de movimientos es muy similar en ambos genotipos, los ratones KO se mantuvieron más tiempo activos, como se puede ver en las gráficas correspondientes a la actividad horizontal, a la actividad vertical y a la velocidad. Por otro lado, los ratones KO también mostraron menor ansiedad que sus congéneres WT, pues permanecieron más tiempo en la zona central del campo; estos datos concuerdan con un estudio realizado por el grupo de *Jia Bei Wang* en el que observaron un comportamiento anti-depresivo y ansiolítico de estos animales en diferentes test comportamentales (Barbier y Wang, 2009).

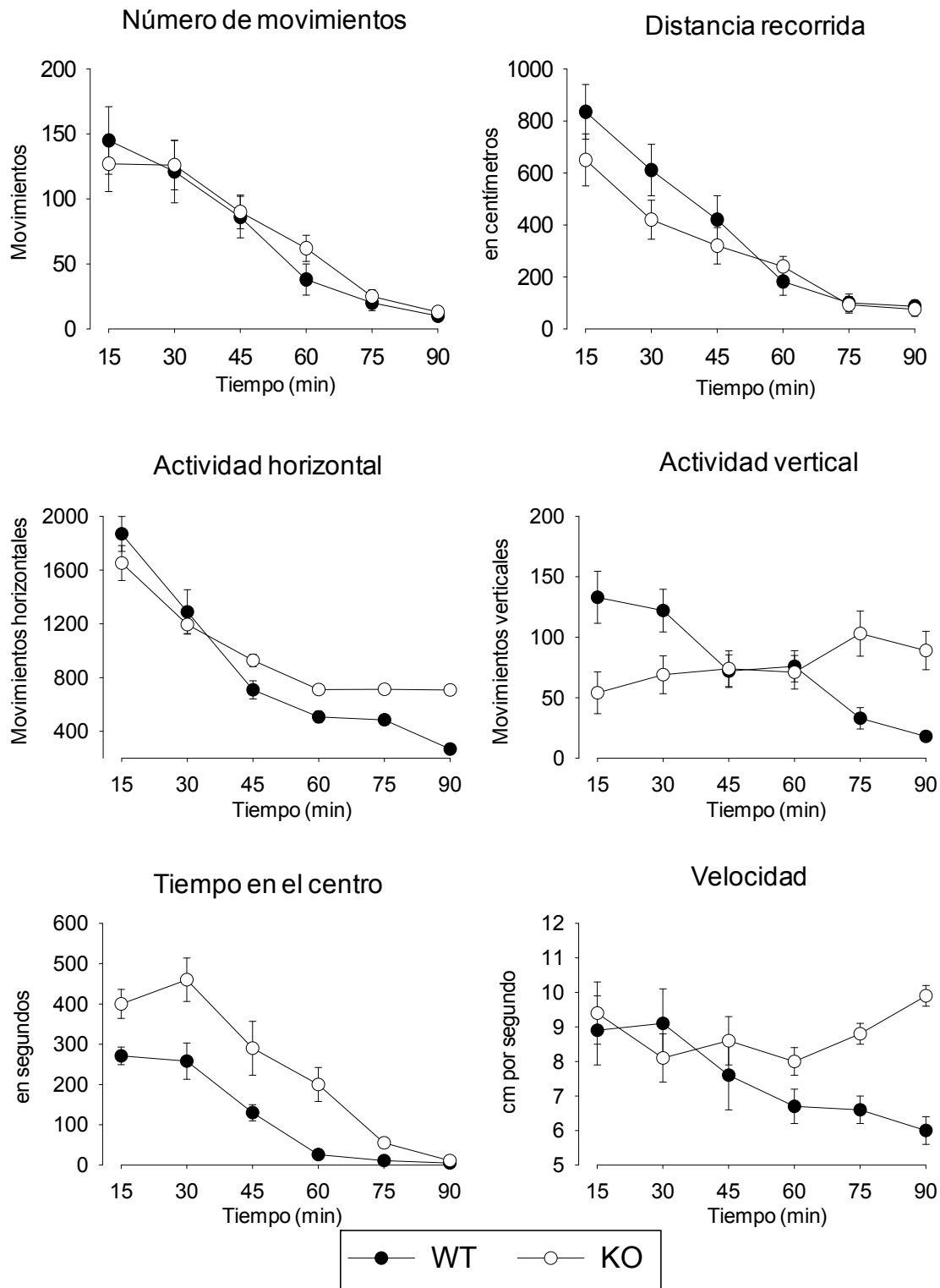


Figura 53. Estudio de la actividad motora espontánea en ratones macho KO y WT para HINT1. Se analizó el número de movimientos, la distancia recorrida (en centímetros), la actividad horizontal, la actividad vertical, el tiempo en el centro (en segundos) y la velocidad (en centímetros/segundo) durante 90 minutos, a intervalos de 15 minutos. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 12 ratones de cada genotipo.

4.2. Analgesia y tolerancia producidas por el agonista cannabinoide WIN55.212-2

En primer lugar, se analizó el efecto analgésico y la tolerancia inducidas por WIN55.212-2 en la cepa de ratones CD1. La respuesta antinociceptiva al cannabinoide se caracterizó administrando diferentes dosis de WIN55.212-2 (0,2, 4 ó 20 nmol/ratón) vía icv. Estas administraciones produjeron en los animales una antinocicepción dosis dependiente en el test de retirada de la cola (figura 54). Los efectos analgésicos tuvieron un pico máximo a los 8 minutos tras la inyección, a partir de ese momento se produjo un descenso progresivo de la analgesia. La dosis de 20 nmol de WIN55.212-2 produjo un efecto que se correspondía al 70 % del EAM observado en este test.

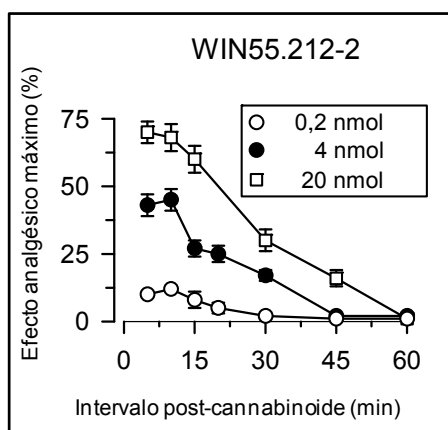


Figura 54. Curso temporal de la respuesta analgésica obtenida tras la administración de diferentes dosis de WIN55.212-2. El agonista cannabinoide se inyectó a los ratones vía icv y se determinó la analgesia a varios intervalos de tiempo empleando el test de retirada de la cola. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones.

Estudios con cannabinoides han demostrado que su administración repetida lleva al rápido desarrollo de tolerancia tanto en humanos como en animales (Jones y col., 1981; Hollister, 1986; Abood y Martin, 1992; Martin y col., 1994). La administración de una dosis aguda de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2, que alcanzó un 70 % del EAM, produjo una profunda desensibilización de su receptor. Así, una segunda dosis de WIN55.212-2 similar, 24 horas después de la inicial, apenas produjo un 20 % del EAM (Figura 55).

Por otra parte, se comprobó si la tolerancia a los efectos analgésicos de WIN55.212-2 se revertía con un inhibidor de PKC, el Gö7874, ya que la tolerancia a opioides como la morfina se revierte al inhibir la actividad de esta quinasa (Garzón y col., 2008). Los animales recibieron vía icv una dosis aguda de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2, a las 24 horas se les administró 1 nmol/ratón de Gö7874, y 30 minutos después fueron

inyectados con una segunda dosis similar a la primera del agonista cannabinoide. En este caso, a diferencia de lo observado para los opioides, la inhibición de la PKC no recuperó la respuesta analgésica a WIN55.212-2 (figura 55).

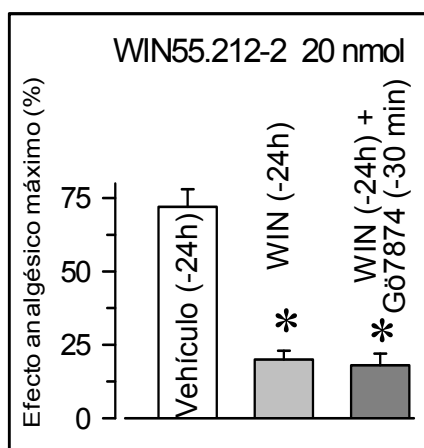


Figura 55. Tolerancia aguda tras la administración de WIN55.212-2. Los animales recibieron una administración inicial de 20 nmol/ratón icv de WIN55.212-2 o vehículo. Después de 24 horas, se evaluó el desarrollo de tolerancia aguda tras la administración de una segunda dosis de 20 nmol/ratón icv del cannabinoide. Paralelamente, otro grupo de ratones al que se le había inyectado 24 horas antes una dosis inicial de 20 nmol/ratón icv de WIN55.212.2, recibió 1 nmol/ratón vía icv de Gö7874 y 30 minutos después una dosis similar a la primera del cannabinoide. El test de retirada de la cola se realizó a los 10 minutos de la última administración del WIN55.212-2. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones. * Diferencias significativas respecto al grupo que recibió vehículo/ WIN55.212-2.

Posteriormente, se analizó el tiempo de recuperación de la analgesia en ratones que habían recibido una dosis aguda de WIN55.212-2. Esos animales se dividieron en grupos y cada grupo recibió una segunda dosis a diferentes intervalos durante los 20 días posteriores a la primera inyección. Se analizó el efecto analgésico mediante el test de retirada de la cola. Se observó que la desensibilización causada por una única dosis de WIN55.212-2 se mantuvo durante varios días y la recuperación de la respuesta llevó de 2 a 3 semanas (figura 56).

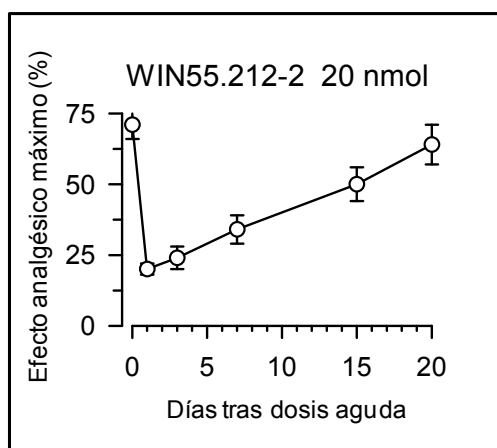


Figura 56. Recuperación de la respuesta analgésica tras la administración aguda de WIN55.212-2. Los animales recibieron una administración inicial de WIN55.212-2 de 20 nmol/ratón vía icv. Una segunda dosis de cannabinoide similar a la primera se fue administrando 1, 4, 7, 12, 16 ó 20 días después. La respuesta analgésica se determinó 10 minutos después de la administración del agonista mediante el test de retirada de la cola. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones.

En segundo lugar, se evaluó la respuesta analgésica y tolerancia en ratones KO y WT para HINT1. Se disminuyeron las dosis de WIN55.212-2 administradas para conseguir un efecto analgésico similar al obtenido en la cepa CD1. Los animales recibieron dosis de 1, 4 ó 6 nmol/ratón del agonista cannabinoide WIN55.212-2 vía icv. La respuesta antinociceptiva se evaluó mediante el test de retirada de la cola a varios intervalos tras la inyección. Ni los ratones WT ni los KO mostraron diferencias dependientes de genotipo en los tiempos de latencia basales. Los tiempos de latencia tampoco se vieron significativamente afectados durante el test por el vehículo del agonista cannabinoide (mezcla 1:1:18 (v/v/v) de etanol: Cremophor EL: suero salino). La administración de 4 y 6 nmol/ratón de WIN55.212-2 produjo un efecto analgésico dosis dependiente, con un pico máximo a los 5 minutos post-inyección, que fue similar en ratones WT y KO. No obstante, la potencia del efecto analgésico tras las dosis de 6 y 4 nmol/ratón de WIN55.212-2 en ratones KO fue ligeramente inferior que la conseguida en ratones WT (figura 57).

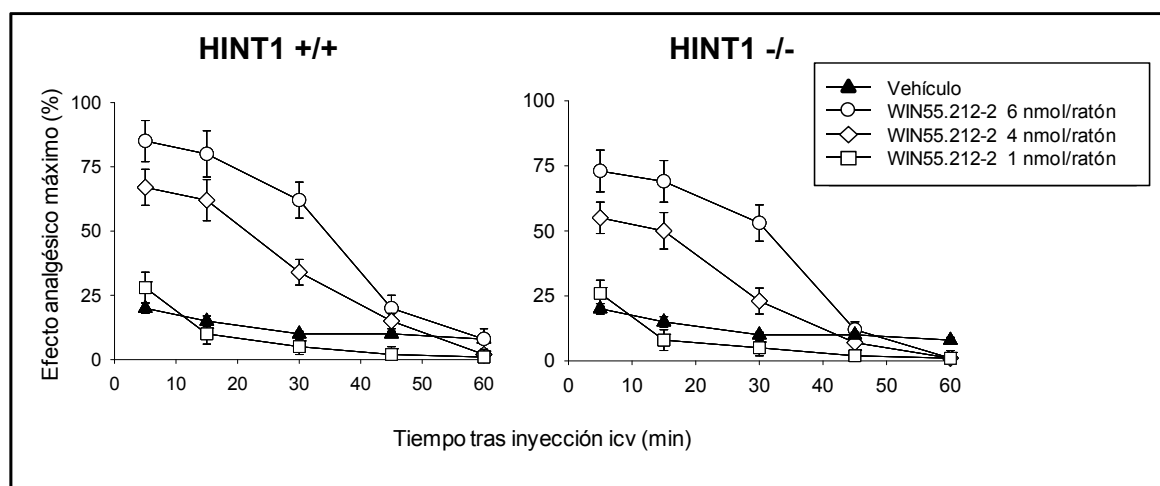


Figura 57. Analgesia inducida por WIN55.212-2 en ratones WT y KO para HINT1. Curso temporal de la respuesta analgésica obtenida tras la administración de 1, 4 y 6 nmol/ratón de WIN55.212-2. Se inyectó el agonista vía icv a los ratones y se determinó la analgesia a los 5, 15, 30, 45 y 60 minutos empleando el test de retirada de la cola. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones.

Para el estudio de la tolerancia los animales se dividieron en dos grupos, uno de ellos recibió una dosis icv de 6 nmol/ratón de WIN55.212-2 y el otro un volumen similar de vehículo. A las 24 horas, los dos grupos recibieron una dosis de 6 nmol/ratón de WIN55.212-2. El efecto analgésico cannabinoide se midió 10 minutos después de la segunda administración. El fenómeno de tolerancia cannabinoide se observa como una disminución significativa en la potencia analgésica inducida por WIN55.212-2 en el grupo que había recibido dos dosis del agonista espaciadas 24 horas respecto al grupo al que sólo se le administró una. En la figura 58, se puede ver que los animales que recibieron una única dosis de WIN55.212-2 presentaron aproximadamente un 70-80 % del EAM (WT y KO, respectivamente), mientras que en los animales que recibieron dos dosis el EAM disminuyó a un 20 % aproximadamente debido al efecto de tolerancia evocada por el agonista.

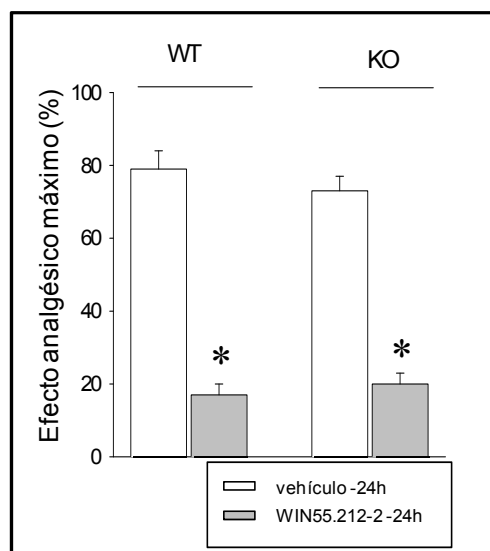


Figura 58. Tolerancia aguda inducida por WIN55.212-2 en ratones WT y KO para HINT1. A las 24 horas de la administración de una dosis de WIN55.212-2 de 6 nmol/ratón vía icv o del correspondiente vehículo, los animales recibieron una segunda dosis de 6 nmol y se determinó el efecto analgésico del cannabinoide a los 10 minutos de la segunda dosis. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones. * Diferencias significativas respecto al grupo que recibió vehículo/WIN55.212-2.

4.2.1. Papel de la RGSZ2 en la analgesia y tolerancia cannabinoide

Se analizó el papel de RGSZ2 en la respuesta analgésica mediada por el receptor cannabinoide tipo 1. Los animales recibieron un tratamiento subcrónico durante 5 días con ODNs antisentido dirigidos frente a la RGSZ2, cuya eficacia y selectividad se habían comprobado previamente. Este procedimiento redujo la RGSZ2 asociada al MOR en un 50-70 %, sin afectar a la expresión de RGSZ1, de las proteínas G o del MOR (Garzón y col., 2005c). El sexto día, se les administró una dosis de WIN55.212-2 de 20 nmol/ratón vía icv y se analizó la analgesia a diferentes intervalos post-agonista (15, 30, 45 y 60

minutos) mediante el test de retirada de la cola. Estos resultados se compararon con un grupo de animales que recibió, también de forma subcrónica, un ODN de secuencia aleatoria u ODN-RD y posteriormente el tratamiento con 20 nmol/ratón de WIN55.212-2. La disminución experimental de la RGSZ2 con ODNs dirigidos frente a una secuencia específica de la proteína condujo a un descenso significativo de la potencia analgésica cannabinoide durante los primeros 30 minutos post-inyección.

También se evaluó la implicación de la RGSZ2 en la aparición de tolerancia tras la administración de una dosis aguda de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2 y luego otra similar a las 24 horas. Los resultados de tolerancia aguda tras una dosis de WIN55.212-2 se compararon con los obtenidos con un grupo de animales control que recibió en primer lugar el vehículo y, 24 horas después, la dosis de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2. La disminución experimental de la proteína RGSZ2 no evitó el desarrollo de tolerancia aguda inducida por WIN55.212-2 (Figura 59).

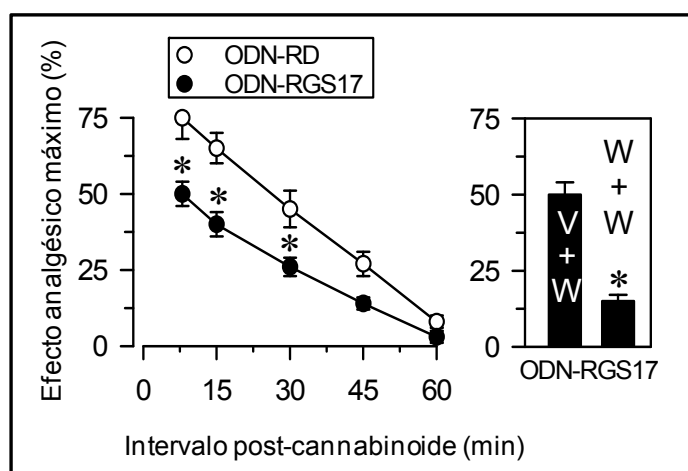


Figura 59. Analgesia y tolerancia aguda inducidas por WIN55.212-2 en ratones KD para RGSZ2. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 8 ratones. * Diferencias significativas respecto al grupo que recibió vehículo/ WIN55.212-2 o respecto al grupo ODN-RD ($p < 0,05$).

4.2.2. Efecto del MK-801 en la analgesia y tolerancia inducidas por WIN55.212-2

Como los NMDARs se han implicado en la mediación de la analgesia cannabinoide (Palazzo y col., 2001; Ghalandari-Shamami y col., 2011), se estudió cómo afecta la administración del antagonista de NMDAR, MK-801, en el efecto analgésico de WIN55.212-2 en ratones CD1 y WT/KO para HINT1. Se utilizó una dosis de 20 nmol/ratón del agonista cannabinoide para la cepa CD1 y de 4 nmol/ratón para los

129/SvJ ya que, como se ha indicado anteriormente, estos ratones son más sensibles a los efectos analgésicos de WIN55.212-2. Para ello, se administró una dosis de 1 nmol/ratón de MK-801 30 minutos antes de la inyección con WIN55.212-2. La respuesta analgésica se evaluó mediante el test de retirada de la cola 10 minutos después de la administración del agonista cannabinoide. Los resultados obtenidos se compararon con la respuesta analgésica resultado de la administración de una dosis similar de WIN55.212-2 sin MK-801. Como se ve a continuación, el bloqueo del NMDAR con MK-801 en ratones CD1 redujo significativamente el efecto analgésico de WIN55.212-2.

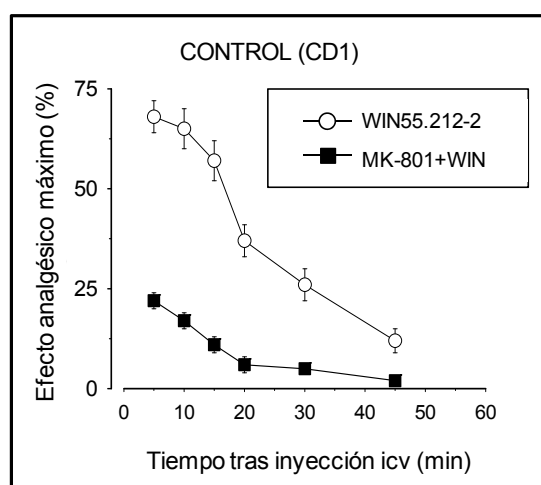


Figura 60. MK-801 revierte el efecto analgésico de WIN55.212-2 en ratones CD1. Dos grupos de ratones recibieron una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2 vía icv. A uno de los grupos se le había administrado el antagonista del NMDAR, MK-801, 30 min antes de recibir la dosis de WIN55.212-2. Se determinó la respuesta analgésica a varios intervalos post-inyección empleando el test de retirada de la cola. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones.

Tras observar la regulación negativa que ejerce el NMDAR sobre la actividad del CB1R, se estudió la implicación de la proteína HINT1 sobre dicha regulación. Se utilizaron ratones WT y KO para HINT1, a los que se administró WIN55.212-2 o MK-801+WIN55.212-2 como se ha descrito anteriormente. El pretratamiento con una dosis de MK-801 fue capaz de bloquear los efectos analgésicos de 4 nmol/ratón de WIN55.212-2 en ratones WT. No ocurrió lo mismo en los ratones KO, en los que la administración de una dosis similar de MK-801 no alteró los efectos analgésicos de WIN55.212-2 (figura 61).

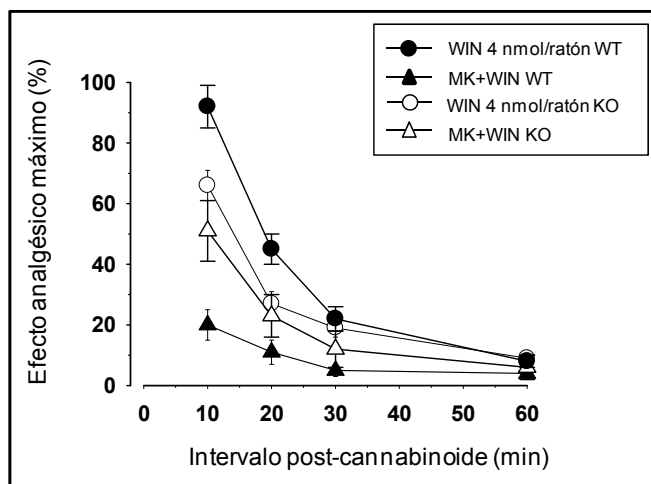


Figura 61. MK-801 no es capaz de revertir el efecto analgésico de WIN55.212-2 en ratones KO para HINT1. Un grupo de ratones WT y otro KO recibieron una dosis de 4 nmol/ratón de WIN55.212-2 vía icv. Otro grupo de ratones KO y WT recibieron una dosis de 1 nmol/ratón de MK-801, 30 minutos antes de recibir el WIN55.212-2. Se determinó la respuesta analgésica a varios intervalos post-inyección empleando el test de retirada de la cola. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones.

Con el fin de estudiar el efecto del MK-801 en el desarrollo de tolerancia aguda a los efectos analgésicos de WIN55.212-2, se administró a los animales por vía icv una dosis de 1 nmol/ratón de MK-801 o salino media hora antes de una dosis icv de 4 nmol/ratón de WIN55.212-2. A las 24 horas de la primera administración de WIN55.212-2, los animales recibieron una segunda dosis del cannabinoide de 4 nmol/ratón y, pasados 10 minutos, se determinó su efecto analgésico mediante el test de retirada de la cola. El pretratamiento de los ratones con MK-801 antes de la primera dosis de WIN55.212-2, no evitó el desarrollo de tolerancia tras una segunda dosis del agonista cannabinoide, ni en ratones WT ni en KO (figura 62).

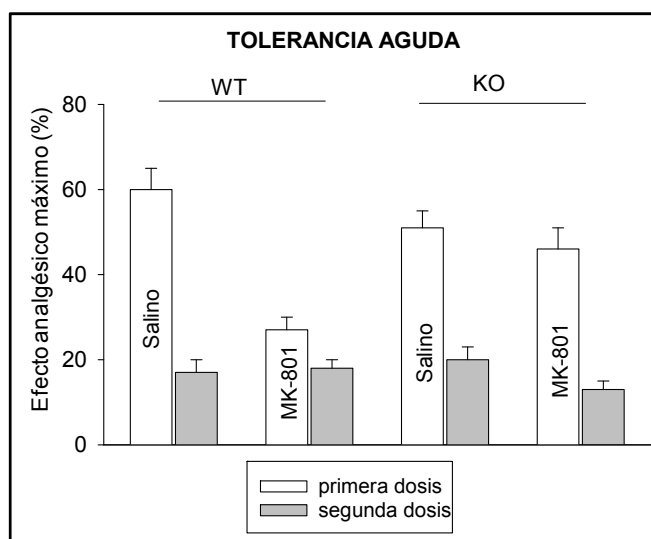


Figura 62. MK-801 no es capaz de prevenir la tolerancia aguda inducida por WIN55.212-2 en ratones KO y WT para HINT1. Los animales recibieron una dosis de MK-801 (1 nmol/ratón) 10 minutos antes de una dosis de WIN55.212-2 (4 nmol/ratón). Pasadas 24 horas se administró una dosis similar del agonista cannabinoide y se determinó su efecto analgésico. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones.

Para analizar el tiempo de recuperación de la respuesta analgésica tras una dosis aguda de 4 nmol/ratón de WIN55.212-2 o de 1 nmol/ratón de MK-801+ 4 nmol de WIN55.212-2 administradas vía icv, los animales se dividieron en grupos y cada grupo recibió una segunda dosis de WIN55.212-2 a diferentes intervalos durante los 10 días posteriores a la primera inyección. Se analizó el efecto analgésico mediante el test de retirada de la cola. Se observó que la tolerancia causada por una única dosis del cannabinoide no se había recuperado incluso 10 días después de la primera administración. Sin embargo, los ratones KO recuperaron el efecto analgésico pasados 5 días de la primera administración de WIN55.212-2. El MK-801 no tuvo ningún efecto sobre el tiempo de recuperación de la respuesta analgésica (figura 63).

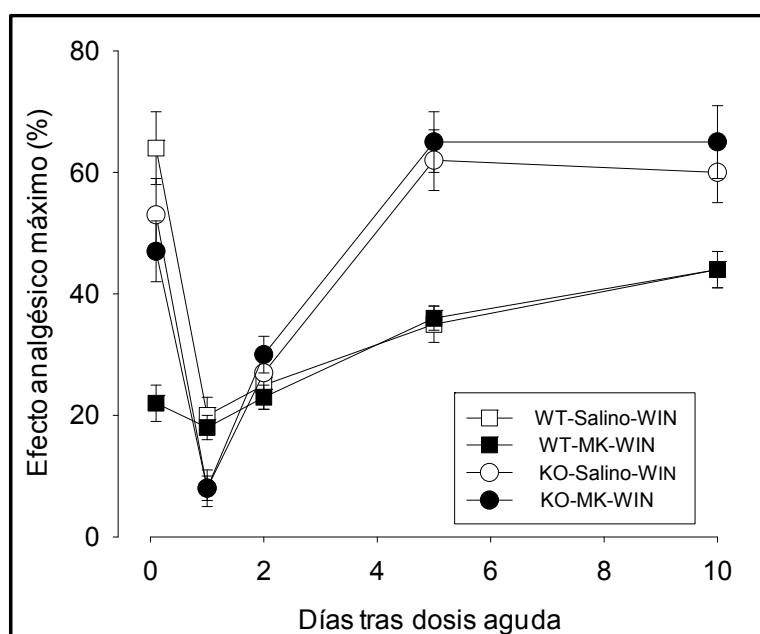


Figura 63. Recuperación de la respuesta analgésica tras la administración aguda de WIN55.212-2 o MK-801+WIN55.212-2. Los animales recibieron una dosis inicial de 4 nmol/ratón de WIN55.212-2 o MK-801 (1 nmol/ratón)+WIN55.212-2. Una segunda dosis del cannabinoide similar a la primera se administró 1, 2, 5 y 10 días después. La mezcla se inyectó vía icv a los ratones y se determinó la analgesia 10 minutos después de la administración del agonista empleando el test de retirada de la cola. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones.

Discusión

Los resultados de este trabajo describen la base molecular por la que MOR y NMDAR ejercen efectos contrapuestos en el control del dolor. El principal hallazgo de esta investigación es la asociación directa entre el MOR y la subunidad NR1 del NMDAR en neuronas de PAG. La activación por morfina rompe esta asociación por un mecanismo que implica a PKC, la cual fosforila NR1 y potencia la vía NMDAR-CaMKII que va a inhibir la señalización MOR, dando lugar a la aparición de tolerancia. Es de resaltar que la inhibición de PKC pero no de otras quinasas (PKA o GRK) recupera la asociación MOR-NMDAR y también el efecto analgésico de la morfina (Rodríguez-Muñoz y col., 2012). En esta asociación es importante la proteína HINT1, que se une al extremo carboxílico del MOR. Su presencia mantiene la conexión/regulación entre el MOR y el NMDAR. La ausencia de HINT1 conlleva una hiperfunción del MOR que se sigue de una profunda tolerancia opioide que no responde a la inhibición de PKC o al antagonismo del NMDAR (Rodríguez-Muñoz y col., 2010).

La modulación farmacológica de la señalización del MOR por la cascada NMDAR/NO está sólidamente documentada (Trujillo, 2002; Garzón y col., 2008). Hoy sabemos que la interacción entre estos receptores es bidireccional ya que la activación del MOR aumenta la actividad NMDAR (Chen y col., 1991; Heinricher y col., 2001), que a su vez va a controlar (reducir) el tono funcional del MOR (Sánchez-Blázquez y col., 2008). Estudios electrofisiológicos y datos anatómicos y ultraestructurales habían sugerido que la interacción entre MOR y NMDAR podría tener lugar en la misma neurona y dentro del mismo compartimento celular (Commons y col., 1999; Trujillo, 2002; Narita y col., 2008; Glass y col., 2009). Nuestro estudio ha demostrado esta interacción, lo que es de particular importancia en el control del dolor resistente a los opioides/opiáceos, como es el caso del dolor neuropático.

Con el fin de explorar si este mecanismo de asociación de GPCRs a NMDAR opera en otros receptores G de nuestro interés, abordamos también el estudio del receptor CB1, que comparte con el opioide los mecanismos de señalización y cuyos agonistas son eficaces analgésicos, principalmente, en cuadros de dolor en los que los opioides no son efectivos. Por ejemplo, en casos de dolor neuropático, se ha observado que los

cannabinoides son más potentes y eficaces que los opioides (Herzberg y col., 1997; Bridges y col., 2001; Fox y col., 2001; Lim y col., 2003; Costa y col., 2004). Como el MOR, el CB1R interacciona funcionalmente con el receptor de NMDA. Existen evidencias que apoyan una modulación glutamatérgica de la antinocicepción cannabinoide (Thorat y Bhargava, 1994; Palazzo y col., 2001). Por otra parte, numerosos trabajos han descrito el papel neuroprotector de la activación de los receptores CB1 en el daño neuronal ocasionado por la sobre-estimulación de los NMDARs (Shen y Thayer, 1998; Kim y col., 2006b; Liu y col., 2009). Los CB1Rs, aunque preferentemente presinápticos, también se han encontrado en la postsinapsis (Hohmann y col., 1999; Ong y Mackie, 1999; Köfalvi y col., 2005; Tappe-Theodor y col., 2007; Scavone y col., 2010), lo que les acerca a una posible regulación glutamatérgica NMDAR-AMPA. De hecho, se ha visto colocalización de los receptores CB1R y NMDAR en neuronas de la región CA3 del hipocampo de rata (Marchalant y col., 2008).

1. Asociación de MOR y CB1R con el NMDAR en PAG

Mediante ensayos de inmunoprecipitación del MOR en membranas de PAG analizamos su posible asociación con diferentes subunidades del NMDAR. En estos ensayos, el MOR coprecipitó con subunidades NR1 frente a las NR2/3 con las que no mostró asociación, por tanto, cabe suponer que el MOR se asocia con el NMDAR a través de la subunidad NR1. Para confirmar este resultado, inmunoprecipitamos las subunidades NR1 presentes en membranas de PAG, separamos por SDS-PAGE los complejos proteicos obtenidos y analizamos mediante inmunodetección la presencia en dichos complejos de dos variantes del MOR, MOR1 y MOR1C; ambas variantes del receptor opioide coprecipitaron con las subunidades NR1, demostrando la asociación entre MOR y NR1 en membranas sinaptosomales de PAG. Ahora bien, la técnica de la inmunoprecipitación no permite concluir si la interacción que se establece entre las proteínas en estudio es directa o si, por el contrario, estas forman parte de un complejo multiproteico que permite su asociación.

Con el fin de estudiar si esta interacción podría ser directa, empleamos diferentes aproximaciones *in vitro* en las que se utilizaron proteínas recombinantes. Observamos que tanto el MOR1 como el MOR1C interaccionan con el segmento C1 de la subunidad NR1 y que estas asociaciones están mediadas por el extremo C-terminal de los MORs, lo que demuestra que el MOR y la NR1 interaccionan directamente *in vitro* a través de sus respectivos extremos citosólicos. El análisis *ex vivo* en PAG de las subunidades NR1 coprecipitadas con el MOR reveló la presencia de las variantes C2 y C2' de la NR1, por consiguiente, el MOR puede asociarse con subunidades NR1 cuyo extremo C-terminal contenga los segmentos C0/C1/C2 o C0/C1/C2'. Además, el receptor opioide también coprecipitó con la proteína postsináptica PSD-95, lo que confirma que MOR se asocia al menos con la variante de la NR1 que contiene la secuencia de anclaje a PSD-95 en el segmento C2' (Kornau y col., 1995).

El estudio de la asociación directa MOR-NMDAR mediante técnicas *in vitro* se complementó con ensayos BiFC, que permiten estudiar la interacción entre proteínas en condiciones más próximas a las fisiológicas. En células CHO, la interacción de las proteínas MOR1 y NR1 C0/C1/C2 fusionadas en su extremo C-terminal a dos fragmentos de la proteína fluorescente Venus, que por sí solos no emiten fluorescencia, permitió la reconstitución de Venus y la recuperación de la señal fluorescente. Estos resultados concuerdan con lo observado *in vitro* y *ex vivo* y confirman la existencia de la asociación entre MOR y NMDAR *in vivo*.

En la misma línea, nuestros resultados demuestran la coprecipitación de CB1R y subunidades NR1 en sinaptosomas de PAG, indicando que los receptores CB1 y NMDA se encuentran estrechamente asociados en este área del SN. Mediante análisis por SPR observamos la interacción directa entre los extremos C-terminales del receptor CB1 y de la subunidad NR1 recombinantes; de nuevo, esta interacción se produjo con las subunidades NR1 que contienen en su secuencia C-terminal el segmento C1, pues no se vio interacción alguna entre las colas citosólicas del receptor CB1 y de la subunidad NR1 C0/C2. Los ensayos de coprecipitación *in vitro* confirmaron este patrón de asociación.

Además, estas interacciones se verificaron *in vivo* mediante ensayos BiFC, que confirmaron la asociación directa CB1R-NMDAR en células vivas.

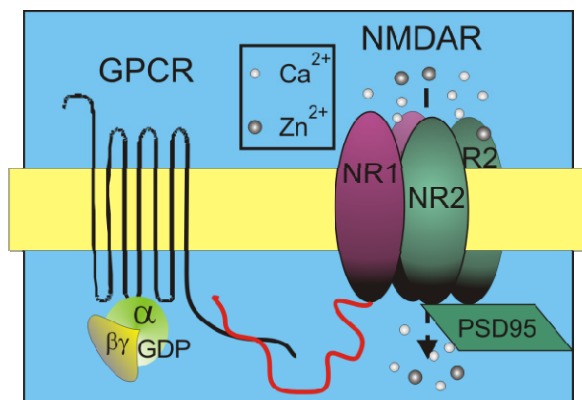


Figura 64. Interacción directa entre GPCRs y NMDARs a través de sus extremos citosólicos. En estado basal, los extremos citosólicos de los receptores opioide Mu y cannabinoide CB1 se asocian con el segmento C-terminal de las subunidades NR1 de receptores NMDA. El receptor G se muestra asociado con el heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ y el NMDAR con la proteína postsináptica PSD-95, componente de los complejos multiproteicos del NMDAR.

Resultados previos de otros grupos describen la interacción directa del receptor dopaminérgico D1 y de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (mGluR1 y mGluR5) con el NMDAR. Liu y colaboradores han demostrado que el D1R se asocia con las subunidades NR1 y NR2A del NMDAR en hipocampo de rata y que interacciona físicamente con ellas en ensayos *pull-down*. Han observado que el receptor dopaminérgico contiene dos dominios separados para la interacción con las distintas subunidades del NMDAR, la asociación con la subunidad NR1₀₁₁ se establece a través del segmento t2 de la cola citoplasmática del receptor G y con la NR2A mediante residuos localizados en la zona t3 del D1R (Lee y col., 2002). En un trabajo posterior del mismo grupo, han determinado que la asociación D1R-t2-NR1 tiene lugar a través del segmento C1 de esta subunidad del NMDAR (Pei y col., 2004). La asociación directa D1R-NR1 se ha demostrado también en células COS-7 mediante ensayos BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) (Fiorentini y col., 2003). Asimismo, Perroy y colaboradores han descrito la interacción física entre mGluRs del grupo I y el NMDAR utilizando la tecnología BRET y la importancia de la región citosólica del receptor metabotrópico en esta asociación, ya que al emplear un mutante del mGluR5a en el que se había delecionado el extremo carboxilo se perdió la señal BRET (Perroy y col., 2008). Estos resultados junto con los obtenidos en nuestro estudio indican que la conexión directa de receptores G y NMDAR es un fenómeno más frecuente de lo que se pensaba hasta el momento, que se debe considerar a la hora de explicar la relación funcional entre algunos GPCRs y el

NMDAR. Concretamente, en receptores G con un extremo C-terminal relativamente largo, como es el caso de los D1R, mGluRs del grupo I, MOR y CB1R, el extremo citosólico podría tener un papel fundamental en la interacción con el NMDAR.

2. Asociación de MOR y CB1R con el módulo de señalización HINT1-RGSZ2

En la conexión funcional entre los GPCRs y el NMDAR se sabe participan una serie de proteínas incluido el módulo HINT1-RGSZ2. Este módulo existe no solo asociado al MOR, sino también al receptor cannabinoide tipo 1. Además, déficits en la expresión de la RGSZ2 exacerban la función NMDAR y reducen la del MOR (Garzón y col., 2011a). Es posible por tanto, que estas proteínas pudiesen actuar como un lugar de convergencia modulando las señales de mutua regulación entre los diferentes receptores acoplados a proteínas G y el NMDAR.

Nuestros datos indican que la proteína HINT1 existe como un homodímero en células vivas, que interacciona físicamente con el extremo C-terminal del MOR. La estructura dimérica confiere a las proteínas de la familia de la tríada de histidinas actividad nucleótido hidrolasa y transferasa (Brenner, 2002). Además, facilita su interacción como proteína de anclaje con terceras proteínas. En el dímero, dos protómeros de HINT1 interaccionan por sus regiones centrales creando una zona con fuerte potencial electrostático negativo; los extremos amino se disponen en la cara externa y las colas citoplasmáticas permanecen en el interior generando una gran superficie de unión a zinc, gracias a la presencia en cada extremo carboxilo de un péptido rico en histidinas (His-Val-His-Leu-His) que interacciona específicamente con iones zinc sin afectar la estructura del dímero (Lima y col., 1996). La fuerte carga negativa junto con la capacidad de unión a iones zinc del homodímero aumentan las posibilidades de la interacción simultánea de HINT1 con diferentes proteínas, como con el extremo C-terminal del MOR, las RGS-RZ, la PKC γ , la Raf1 y quizás también con la NR1 (Guang y col., 2004; Ajit y col., 2007; Rodríguez-Muñoz y col., 2008; Rodríguez-Muñoz y col., 2011).

Trabajos previos muestran que el MOR neural coprecipita con proteínas RGSZ2 (Garzón y col., 2005c; Garzón y col., 2005d; Rodríguez-Muñoz y col., 2007a). Sin embargo, nuestro estudio demuestra que no hay una interacción directa entre estas dos proteínas. En este sentido, se ha descrito que HINT1 puede funcionar como nexo de unión entre el MOR y la RGSZ1 (Ajit y col., 2007). Nosotros hemos estudiado si HINT1 se une a la RGSZ2 y, efectivamente, ambas proteínas interaccionan de forma directa en ensayos de coprecipitación *in vitro*, SPR y BiFC, de manera que la proteína HINT1 sirve de nexo de unión entre las RGSZ1/RGSZ2 y el extremo C-terminal del MOR.

El acoplamiento mediado por HINT1 entre la proteína RGSZ2 y el extremo C-terminal del MOR es particularmente interesante. Las RGSZ se han implicado en los procesos adaptativos que tienen lugar tras la administración de morfina, que llevan a la disminución de la señalización del receptor. La desensibilización del MOR es resultado de la transferencia de subunidades $G\alpha$ a proteínas RGS, por ejemplo a las RGSZ2, y la subsiguiente fosforilación del receptor (Garzón y col., 2005c; Rodríguez-Muñoz y col., 2007c; Sánchez-Blázquez y col., 2010). Ahora conocemos mejor cómo funciona este mecanismo de regulación. Tras el estímulo morfinico, el complejo HINT1-RGSZ2 recluta PKC γ al extremo C-terminal del MOR de forma dependiente de zinc (Rodríguez-Muñoz y col., 2008). La RGSZ2 une las subunidades $G\alpha$ activadas por MOR y es en este momento cuando la PKC γ segrega al dímero RGSZ2- $G\alpha$ de la proteína HINT1. Sin embargo, sin la activación del receptor y, por tanto, sin que haya tenido lugar la transferencia de proteínas $G\alpha$ a la RGSZ2, la PKC γ apenas produce la segregación de los componentes del complejo. Por lo tanto, existe un mecanismo estrechamente regulado en el que la PKC γ es mantenida fuera de las proximidades del MOR y el complejo HINT1-RGSZ2 está protegido de los efectos de PKC hasta que las subunidades $G\alpha$ GTP se unen a la RGSZ2. Cuando la analgesia opioide ha cesado, el MOR recupera el control de la subunidades $G\alpha$ segregadas y se resensibiliza. Esto se observa principalmente para agonistas opioides como DAMGO y para dosis de morfina que podemos denominar bajas y que producen escasa o nula desensibilización del receptor (Rodríguez-Muñoz y col., 2007c).

La atenuación de la señalización del MOR que se desarrolla tras una sola dosis icv de 10 nmol de morfina requiere un aumento de la actividad de la cascada NMDAR-CaMKII. Sin embargo, los efectos analgésicos de los opioides que promueven la internalización del MOR, como DAMGO, no se regulan eficientemente por el NMDAR (Garzón y col., 2008). Estudios de interferencia de unión nos han permitido reconocer la secuencia de interacción entre el extremo C-terminal del MOR y el homodímero de HINT1 que comprende los residuos 354-357 TSST de la región citosólica del receptor opioide (Rodríguez-Muñoz y col., 2010). Opioides como DAMGO promueven la fosforilación de algunos de estos residuos, particularmente de la Ser355 y la Thr357 (Wang, 2000; Chavkin y col., 2001; Wang y col., 2002), induciendo la liberación de la HINT1 acoplada al MOR en un proceso que probablemente es necesario para la internalización del receptor (Rodríguez-Muñoz y col., 2010). Esta función se ha atribuido a la acción de la GRK2 (Wang, 2000). En nuestro estudio, el análisis *ex vivo* del PAG de animales que habían recibido una dosis icv de 10 nmol de morfina no promovió la pérdida de MORs en superficie ni la disociación entre el homodímero de HINT1 y el extremo citosólico del receptor opioide. En neuronas, la GRK2/3 se asocia con el MOR activado por morfina aunque no separa la HINT1 del MOR y apenas puede acceder a la Ser375, relacionada con la internalización del receptor (El Kouhen y col., 2001; Rodríguez-Muñoz y col., 2007b); sin embargo, puede participar en la desensibilización del MOR de membrana fosforilando la Thr180 del segundo bucle citoplasmático del receptor, implicada en el acoplamiento entre el MOR y sus proteínas G (Clever y col., 2004). Así, la proteína HINT1 promueve la desensibilización del MOR mediada por el NMDAR en respuesta a morfina, al obstaculizar la internalización del MOR que permanece en la membrana expuesto a la acción negativa de la vía del NMDAR.

De hecho, la proteína HINT1 tiene un papel esencial en la regulación recíproca de receptores MOR y NMDAR. En nuestros análisis por SPR, HINT1 se unió de forma directa a subunidades NR1 que contenían el segmento C1, sin embargo, no interaccionó con las NR1 que carecían de este segmento. En consecuencia, HINT1 se asocia simultáneamente con el extremo C-terminal del MOR y con la región C1 de las subunidades NR1, conectando así el receptor opioide con el NMDAR. Asimismo, a través

del acoplamiento con HINT1, el MOR activado facilita la interacción en su entorno de dos cascadas de señalización que se han implicado en la potenciación de la función NMDAR, hablamos de las cascadas de la PKC γ /Src y de Ras/Raf1/MEK/ERK1/2 (Rodríguez-Muñoz y col., 2011). En presencia de zinc, los dominios ricos en cisteínas situados en las regiones regulatorias de los extremos N-terminales de Raf1 y PKC γ se unen a los residuos de histidinas de HINT1. La PKC γ puede regular la función de la Raf1 por fosforilación, particularmente en las serinas 497 y 499 (Leicht y col., 2007), aumentando su actividad (Kolch y col., 1993) e intensificando la activación de MEK/ERK1/2. Más aún, la PKC γ reclutada por MOR puede activar Src que, de igual forma, puede regular la actividad de Raf-1 fosforilando los residuos de tirosina 340/341 (Leicht y col., 2007).

Por otra parte, nuestros resultados demuestran que el CB1R coprecipita con la HINT1 y con proteínas RGS de la subfamilia RZ (RGSZ1 y RGSZ2) en membranas sinaptosomales de PAG. Es más, HINT1 y RGSZ2 pueden interaccionar directamente con el receptor cannabinoide, como muestran los ensayos de SPR; resultado que también se demostró mediante análisis por BiFC. La presencia del complejo HINT1-RGSZ2 asociado a MOR y a CB1R, además de reclutar PKC γ inactiva al entorno del receptor (Rodríguez-Muñoz y col., 2008; Garzón y col., 2009), ayuda a desactivar las subunidades Gaz-GTP activadas por agonista (Ajit y col., 2007; Garzón y col., 2009). Las señales Gaz son mediadoras esenciales de los efectos analgésicos supraespinales de la morfina y de agonistas del CB1R como WIN55.212-2. La tasa de hidrólisis de GTP de las proteínas Gaz activadas es 200 veces más lenta que la de otras subunidades G α (Casey y col., 1990). Por tanto, su desactivación requiere de GAPs específicos, RGSZ1 y RGSZ2, que aumentan su tasa de hidrólisis de GTP y evitan una regulación excesiva de los efectores con el consiguiente riesgo de desacoplamiento (Garzón y col., 2005c). Se entiende así, que en ausencia de estos GAPs la Gaz activada produzca una profunda desensibilización del MOR y del CB1R (Garzón y col., 2004; Sánchez-Blázquez y col., 2005; Garzón y col., 2005c). En este sentido, cuando lo que se reduce es la expresión de la Gaz la desensibilización que habitualmente produce la administración de varias dosis de morfina o de WIN55.212-2 es de menor magnitud (Garzón y col., 2009).

Nuestros datos demuestran que la inyección icv de WIN55.212-2 induce la internalización de los CB1R, así como una transferencia reversible de proteínas G a las RGSZ2 (Garzón y col., 2009). Los mismos efectos se han observado tras la administración de DAMGO (Garzón y col., 2005c). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el opioide, el WIN55.212-2 produce una profunda tolerancia analgésica que persiste incluso después de que se recuperen los niveles del receptor en membrana y de su reasociación con las proteínas G (Garzón y col., 2009). Estas diferencias podrían explicarse por las distintas subunidades G activadas por estos agonistas tras la unión a sus respectivos receptores. Los efectos analgésicos de WIN55.212-2 están mediados principalmente por las Gi2/Gz mientras que el DAMGO requiere Gi/o y en mucha menor proporción las Gz (Garzón y col., 1997; Garzón y col., 1998; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1998; Sánchez-Blázquez y col., 2001).

Como ya hemos comentado, morfina y WIN55.212-2 activan proteínas Gz para producir analgesia a nivel supraespinal. No obstante, después de una sola inyección de morfina con capacidad de producir tolerancia se necesitan alrededor de tres días para recuperar la respuesta analgésica (Garzón y col., 2002), mientras que en el caso del WIN55.212-2 este tiempo supera las dos semanas. Estas observaciones sugieren que el CB1R ejerce un menor control sobre la capacidad desensibilizante de las G α z respecto al MOR. Tras la estimulación del MOR por morfina, una parte importante de las subunidades G α z activadas se regulan por las RGSZ2 y RGSZ1 acopladas al MOR, aunque las RGSZ1 parecen participar en menor medida en su control (Garzón y col., 2004; Garzón y col., 2005c). La administración de una dosis lo suficientemente elevada del opioide genera tolerancia a los efectos analgésicos de la morfina; en estas condiciones, la activación del MOR no parece provocar desacoplamiento de efectores, lo que indica que las subunidades G α z siguen reguladas. En concordancia con este hecho, la tolerancia a morfina se revierte con inhibidores de PKC o antagonistas de NMDAR (Rodríguez-Muñoz y col., 2010). En el caso del CB1R, la tolerancia a largo plazo sí puede estar ocasionada por el desacoplamiento de efectores. Nuestros resultados demuestran que el bloqueo del NMDAR con MK-801 y la inhibición de PKC por Gö7874 no revierten la tolerancia analgésica a WIN55.212-2, a diferencia de lo que ocurre con la morfina. Este

desacoplamiento de los efectores por *Gaz* puede ser una de las causas del desarrollo de desensibilización heteróloga entre MOR y CB1R. Ambos receptores presentan una distribución similar en diferentes áreas del SNC e incluso se ha descrito su colocalización en neuronas del estriado y médula espinal (Rodríguez y col., 2001; Salio y col., 2001), lo que sugiere que MOR y CB1R podrían compartir efectores comunes, como la adenilato ciclasa V que es inhibida por *Gaz* (Kozasa y Gilman, 1995) y resulta esencial en la respuesta analgésica a morfina (Kim y col., 2006a). Se ha observado que la administración *icv* de una dosis de WIN55.212-2 disminuye la respuesta analgésica a morfina, por el contrario, la inyección *icv* del opioide no tiene ningún efecto sobre la analgesia producida por WIN55.212-2. En cambio, en ratones KD de *Gaz* el WIN55.212-2 no produce tolerancia cruzada a morfina (Garzón y col., 2009).

Nuestros estudios han demostrado que tras la administración de WIN55.212-2 los CB1R internalizados coprecipitan con HINT1 y RGSZ2. La internalización del receptor cannabinoide junto con parte de su maquinaria de transducción podría reducir el control de las RGSZ1/RGSZ2 sobre las subunidades *Gaz*, lo que les permitiría alcanzar sin restricciones a sus efectores causando su sobre-activación y desacoplamiento. Es de destacar que endocannabinoides como la anandamida apenas promueven la internalización del CB1R, y que animales tolerantes a anandamida no muestran tolerancia cruzada a las respuestas antinociceptivas inducidas por agonistas de los receptores MOR, DOR y KOR (Welch, 1997). Por tanto, ligandos cannabinoide exógenos como WIN55.212-2 podrían forzar la internalización de los CB1Rs y perturbar el control adecuado de las subunidades *Gaz*.

3. Efecto de la morfina en la dinámica de asociación MOR-NMDAR. Papel de la PKC en la disociación del complejo

En nuestro estudio observamos que la inyección *icv* de 10 nmol de morfina produjo una disociación progresiva del complejo MOR-NR1, que coincidió con la disminución del efecto analgésico de la morfina y con el desarrollo de tolerancia. Por tanto, el complejo MOR-NR1 puede ser necesario para la antinocicepción inducida por

morfina. De hecho, un estudio reciente revela que ratones KD de subunidades NR1 presentan menor sensibilidad a morfina con respecto a los ratones WT (Dykstra y col., 2011), lo que apoya la idea de que los complejos MOR-NR1 pueden potenciar la antinocicepción inducida por morfina, mientras que su disociación permitiría la acción inhibitoria del NMDAR sobre el MOR.

La PKC, y hasta cierto punto la PKA, se han implicado sistemáticamente en el desarrollo de tolerancia a los efectos analgésicos de la morfina, que induce una escasa internalización del MOR (Garzón y col., 2008), mientras que la GRK2/3 controla los efectos de agonistas del MOR como DAMGO, fuertes inductores de la internalización del receptor (Hull y col., 2010). En el SNC, la PKC regula negativamente la analgesia a morfina, pero no la de DAMGO, a través de la potenciación de la función NMDAR (Bilsky y col., 1996; Lu y col., 1999; Sánchez-Blázquez y col., 2009) (figura 65). De las 11 isoformas conocidas de PKC únicamente PKC α , PKC β y PKC γ estarían implicadas en la desensibilización de MOR (Ventayol y col., 1997; Granados-Soto y col., 2000; Narita y col., 2001; Zeitz y col., 2001; Narita y col., 2002). Concretamente, la PKC γ parece jugar un papel especialmente relevante ya que se ha descrito su expresión exclusiva en neuronas de cerebro y médula espinal (Saito y col., 2002). Nuestros resultados indican que la exposición del extremo C-terminal de la NR1 C0/C1/C2 a la acción de la PKC γ disminuyó en gran medida la asociación directa entre MOR y NR1. En consonancia con este hecho, el inhibidor de PKC, Gö7874, bloquea la disociación del complejo MOR-NR1 inducida por morfina (Rodríguez-Muñoz y col., 2012). Existen numerosas evidencias en la bibliografía que implican a la PKC en la regulación bidireccional entre los receptores MOR y NMDAR. Se ha demostrado que la PKC potencia la actividad del NMDAR fosforilando residuos del segmento C1 de la subunidad NR1, concretamente la Ser890 y la Ser896, y evitando la unión inhibitoria de Ca²⁺-CaM a esta región (Chakravarthy y col., 1999). La PKA también se ha implicado en la fosforilación de la serina 897 del segmento C1 de la NR1, sin embargo, la fosforilación por PKC γ de la serina 890 de la NR1 disminuye el número de estas subunidades en membrana, que vuelven a la superficie tras su defosforilación; fenómeno que no se observa cuando están fosforiladas las serinas 896 ó 897 de la NR1 (Tingley y col., 1997).

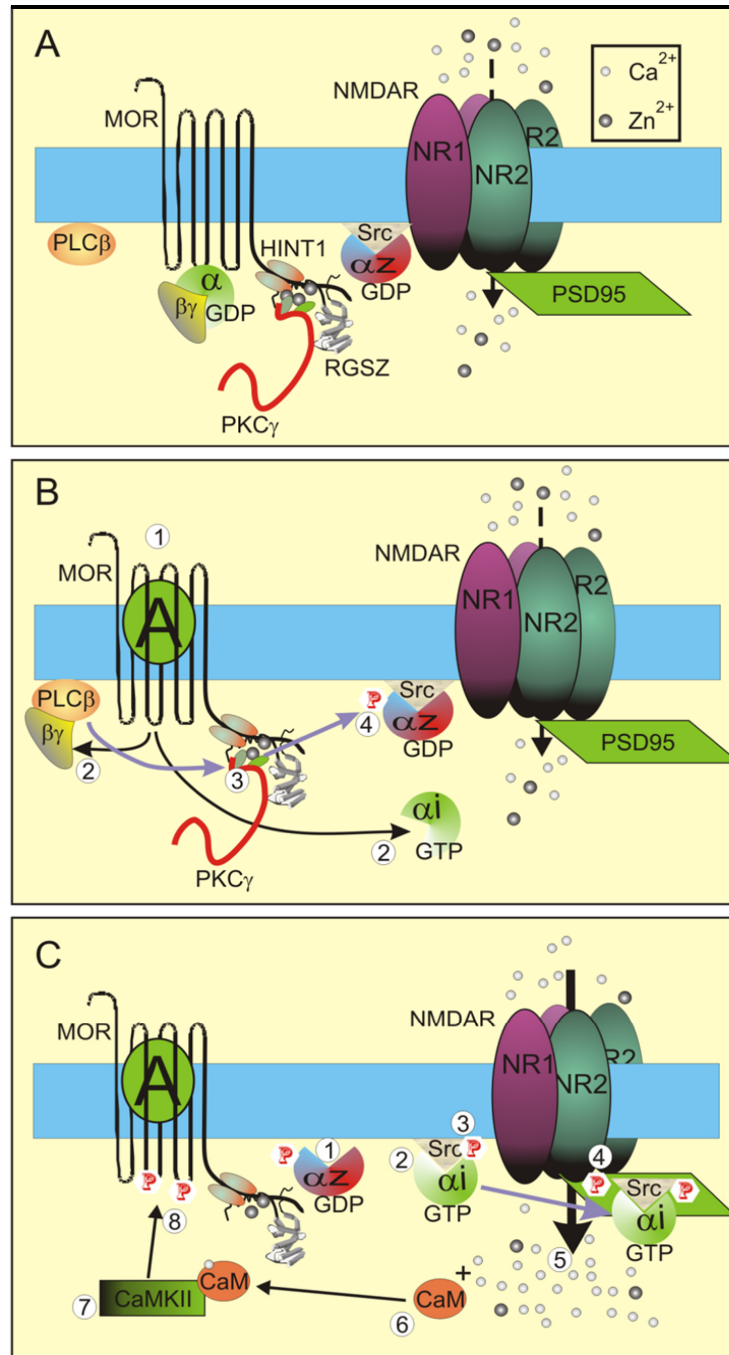


Figura 65. Regulación bidireccional MOR-NMDAR por PKCγ/Src. Tras la activación del MOR por morfina (B, 1), la acción combinada de Src y PKCγ permite la transmisión de señales del receptor opioide al NMDAR. La activación del MOR induce la liberación de dímeros Gβγ de las subunidades Gαi unidas a GTP. Los dímeros Gβγ libres activan PLCβ (B, 2). El aumento de los niveles de DAG y de iones Ca^{2+} promueve el reclutamiento de PKCγ al módulo HINT1-RGSZ (B, 3) y, al llegar a un nivel adecuado, la activación y translocación a membrana de la quinasa. La PKCγ activada actúa sobre el complejo $G\alpha Z$ -Src (B, 4), facilitando su separación (C, 1). La Src se une a las subunidades $G\alpha 2$ GTP activadas por el MOR (C, 2), donde se activa por autofosforilación en la tirosina 416 (C, 3). La Src activada fosforila residuos específicos de las colas citoplasmáticas de las subunidades NR2A y NR2B, potenciando la función del NMDAR (C, 4). Estas modificaciones producen un aumento de la permeación de iones Ca^{2+} hacia el citosol de la postsinapsis (C, 5). Como resultado, se activa la CaMKII (C, 6, 7), que se transloca a las proximidades del MOR promoviendo su fosforilación y el desacoplamiento de su transducción regulada (C, 8).

El hecho de que los receptores MOR y NMDAR se separen tras la administración de agonistas opioides, independientemente de su capacidad para promover la internalización del MOR, diferencia esta asociación de la descrita para los D1R y los mGluR5a con el NMDAR (Fiorentini y col., 2003; Pei y col., 2004; Perroy y col., 2008), que no se disocian tras la activación de ninguno de los componentes del complejo. El NMDAR asociado con el D1R inmoviliza a los receptores dopaminérgicos en la membrana plasmática, evitando su internalización tras la activación por agonista. Además, la estimulación de los NMDARs aumenta la acumulación de AMPc mediada por el D1R activado al favorecer la inserción en membrana de receptores D1 presentes en citosol (Pei y col., 2004). Las diferencias observadas entre MOR y D1R pueden estar debidas a las proteínas G que participan en la señalización de cada uno de estos receptores y a los segundos mensajeros y efectores que estas activan; el MOR regula proteínas Gi/o/z que conducen a la inhibición de la adenilato ciclasa, mientras que la activación de los receptores D1 está acoplada a proteínas Gs que activan adenilato ciclasa, aumentando la concentración intracelular de AMPc. En nuestro estudio, las diferencias observadas entre MOR y CB1R son menores, pues ambos receptores se disocian del NMDAR tras su activación por agonista, quizás como consecuencia de que ambos GPCRs regulan las mismas proteínas G; si bien, aún dentro de las similitudes, cada agonista posee características que le son propias y que pueden afectar a la asociación GPCR-NMDAR. Por otro lado, la interacción entre NMDAR y mGluR5a inhibe constitutivamente la función de ambos receptores, sin afectar su expresión en superficie; los mGluR5a disminuyen las corrientes de Ca^{2+} a través del canal del NMDAR y, recíprocamente, el NMDAR reduce la capacidad de los receptores mGluR5a de liberar Ca^{2+} intracelular. En esta conexión inhibitoria bidireccional el extremo citosólico del mGluR5a tiene un papel esencial pues su delección impide la interacción mGluR5a-NMDAR y también su relación funcional (Perroy y col., 2008).

Tras la disociación del complejo MOR-NMDAR, la administración de una segunda dosis de 10 nmol de morfina 24 horas después de la inicial promovió la endocitosis del receptor opioide y redujo algo más el número de complejos MOR-NR1 en membrana. La fosforilación de la serina 375 en el extremo carboxílico del MOR está asociada a la internalización del receptor inducida por agonista (El Kouhen y col., 2001;

Schulz y col., 2004). Una dosis de morfina no varía sustancialmente los niveles de MORs en superficie y apenas promueve la fosforilación de la Ser375 del receptor, sin embargo, la administración de una segunda dosis de morfina promueve la fosforilación de este residuo de serina mediada por GRK2, lo que conllevaría la internalización y posterior reciclaje del MOR (Rodríguez-Muñoz y col., 2007c). Así, la separación de la NR1 y el MOR permitiría a la GRK2 actuar sobre residuos de serina/treonina implicados en la internalización del receptor. Si bien, el reciclaje de los MORs internalizados no permite la recuperación completa de la potencia analgésica inicial de la morfina, aunque no se observaron ahora mayores pérdidas de potencia tras nuevas dosis del opioide (Rodríguez-Muñoz y col., 2007c). Estas observaciones sugieren que la primera dosis de morfina desencadena un ciclo negativo de regulación desde los NMDARs estimulados por MOR que causa el desarrollo de tolerancia aguda a morfina, disminuyendo la analgesia producida por dosis sucesivas del agonista.

4. Efecto del WIN55.212-2 en la dinámica de asociación CB1R-NMDAR

Como ya hemos comentado, la internalización de GPCRs es un fenómeno común observado tras la estimulación por agonista. Así, los cannabinoides inducen la internalización de sus receptores a través de vesículas recubiertas de clatrina, de forma dependiente de dinamina (Hsieh y col., 1999). Si bien, la eficiencia de los agonistas cannabinoides para estimular la endocitosis difiere. Este hecho parece estar relacionado con la eficacia del agonista para activar al receptor. Agonistas cannabinoides con una eficacia alta de activación del receptor (WIN55.212-2, CP55.940 y HU210) causan una rápida internalización, mientras que metanandamida y THC muestran una baja capacidad endocítica que se corresponde con su baja eficacia intrínseca (Hsieh y col., 1999).

Nuestros resultados demuestran que WIN55.212-2 induce la internalización del CB1R tanto en cerebro de ratón como en astrocitos corticales de rata. En concreto, en el PAG, el efecto de una sola administración icv del cannabinoide redujo los niveles de CB1Rs en la membrana sinaptosomal en un 60-70% durante el curso del efecto analgésico del agonista; esta disminución se acompañó de un incremento de la presencia del receptor

en citosol. De la misma manera, la incubación de astrocitos con WIN55.212-2 1 μ M durante una hora redujo el número de receptores a nivel de superficie. Cuando el efecto analgésico del agonista cannabinoide hubo cesado, se fueron recuperando los niveles iniciales de receptores de membrana, probablemente, gracias al reciclaje de receptores internalizados o a la inserción de receptores sintetizados *de novo*. Como resultado, 24 ó 48 horas después los niveles de CB1R en membrana eran comparables a los observados antes de la administración de WIN55.212-2.

La internalización del receptor CB1R trajo consigo una disminución de la cantidad de subunidades NR1 asociadas a los receptores cannabinoides expresados en superficie, que alcanzó un máximo a los 30 minutos post-inyección. Sin embargo, los CB1Rs endocitados no estaban asociados con subunidades NR1. Estos resultados indican que el WIN55.212-2 promueve la separación del complejo CB1R-NMDAR durante el transcurso del efecto analgésico del cannabinoide, en un proceso que probablemente es necesario antes de la internalización del receptor. Una hora después de la administración del WIN55.212-2, coincidiendo con la atenuación de la respuesta antinociceptiva, la asociación del CB1R con subunidades NR1 en membrana fue aumentando progresivamente hasta recuperar los niveles basales a las 24 horas post-inyección. Esto difiere de lo observado con el MOR activado por morfina, que no se separa del NMDAR hasta que los efectos del opioide han cesado y que tarda dos/tres días en reasociarse completamente con las subunidades NR1 en membrana (manuscrito en preparación).

Puesto que los receptores CB1R y NMDAR están asociados en PAG, analizamos cómo afectaba el bloqueo del NMDAR en el tráfico del CB1R inducido por WIN55.212-2. Observamos que la administración icv de MK-801 previa a la estimulación cannabinoide impidió la translocación del CB1R al citosol. De forma similar, el pretratamiento con MK-801 y posterior administración de tres dosis consecutivas de WIN55.212-2 vía icv, bloqueó la internalización del receptor cannabinoide que se había observado tras la estimulación repetida del receptor con el agonista. En consecuencia, parece que la activación del NMDAR es necesaria para la internalización del CB1R, lo que nos lleva a pensar que el receptor cannabinoide activado por WIN55.212-2 podría promover una

potenciación temprana de la actividad del NMDAR que permitiese la disociación del complejo y posterior endocitosis del receptor cannabinoide. A este respecto, se ha detectado un incremento de los niveles extracelulares de glutamato *in vitro* e *in vivo* tras la activación del CB1R por WIN55.212-2 (Ferraro y col., 2001). En este contexto, es de destacar que en ratones KO para HINT1 el pretratamiento con MK-801 no impidió la internalización del CB1R inducida por WIN55.212-2. Estos resultados sugieren que la proteína HINT1 es necesaria para la formación del complejo CB1R-NMDAR o para que la conexión entre ambos receptores sea estable; en ausencia de HINT1 estos receptores no estarían asociados o lo estarían débilmente y el CB1R podría internalizarse independientemente del estado de activación del NMDAR. Será necesario realizar nuevos ensayos para evaluar la asociación entre CB1R y NMDAR en ausencia de HINT1 así como las consecuencias funcionales que conlleva la falta de esta proteína.

Estudiamos también la influencia de la internalización del CB1R en la estabilidad del NMDAR. La administración *in vivo* de una dosis de 20 nmol de WIN55.212-2 promovió la translocación al citosol de las subunidades NR1 a los 30 minutos post-inyección. Por tanto, tras la activación inicial del NMDAR inducida por CB1R, el receptor cannabinoide inhibe la función del NMDAR causando su internalización. Numerosos estudios muestran que los cannabinoides ejercen un control negativo sobre la función del receptor glutamatérgico de NMDA. Así, la activación de receptores CB1R protege frente a la excitotoxicidad neuronal (Kim y col., 2006b; Liu y col., 2009), bloqueando la hiperfunción del NMDAR (Palmer, 2001; Lipton, 2006). La conexión negativa funcional CB1R-NMDAR también se ha implicado en la respuesta analgésica evocada por cannabinoides; la disminución de la actividad del CB1R mediante la reducción de sus niveles de expresión con ODNs o por la administración intratecal de antagonistas como el SR141716A, produce hiperalgesia dependiente del NMDAR (Richardson y col., 1998). Además, en situaciones de dolor neuropático los cannabinoides son capaces de contrarrestar la hiperfunción del NMDAR y producir sus efectos analgésicos (Ashton y Milligan, 2008).

Por otro lado, el tratamiento con 3 dosis repetidas de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2 vía icv produjo una intensa internalización de subunidades NR1 en comparación con la provocada por una sola dosis icv del cannabinoide. En vista de estos resultados, un tratamiento crónico con agonistas cannabinoides podría producir una desregulación de la neurotransmisión glutamatérgica, alterando la expresión en membrana de los NMDARs. En este sentido, algunos estudios han descrito que los cannabinoides producen alteraciones neuroquímicas de larga duración en el sistema glutamatérgico, sugiriendo la posibilidad de una asociación CB1R-NMDAR. En ratas, la exposición prenatal a WIN55.212-2 reduce la función NMDAR a nivel cortical y causa una serie de alteraciones cognitivas en la descendencia, como déficits en el aprendizaje y una menor reactividad emocional (Antonelli y col., 2005). Es más, la administración repetida durante 7 días consecutivos de THC por vía intraperitoneal inhibe el fenómeno de la potenciación a largo plazo en hipocampo mediante un mecanismo dependiente del CB1R, como consecuencia de una disminución (endocitosis y pérdida de receptores en membrana) de la presencia de la subunidad GluR1 del receptor AMPA y de las subunidades NR2A y NR2B del NMDAR en la postsinapsis (Fan y col., 2010). De este modo, la conexión CB1R-NMDAR parece ser responsable de alteraciones neuroquímicas duraderas en el sistema glutamatérgico y explicaría, al menos en parte, la implicación de los cannabinoides en enfermedades mentales como psicosis y esquizofrenia.

Estudios epidemiológicos indican que el abuso de cannabis es un factor de riesgo para el desarrollo de psicosis, que circunstancialmente puede precipitar la aparición de esquizofrenia o intensificar sus síntomas (Degenhardt y col., 2003; Fernández-Espejo y col., 2009), en personas con cierta vulnerabilidad (Harrison y Weinberger, 2005; Cannon y Clarke, 2005). Animales tratados crónicamente con agonistas cannabinoides como THC o WIN55.212-2 durante la adolescencia muestran en la edad adulta síntomas típicos de la etiología de la esquizofrenia (Biscaia y col., 2003; Schneider y Koch, 2003; O'Shea y col., 2004). Además, la administración de agonistas del CB1R como WIN55.212-2, AM404 o CP55.940 disminuye la inhibición prepulso (Mansbach y col., 1996; Schneider y col., 2003; Fernández-Espejo y Galán-Rodríguez, 2004), mientras que antagonistas cannabinoides como SR141716A y AM251 actúan como antipsicóticos revirtiendo la

reducción de la inhibición prepulso inducida por fenciclidina y dizolcipina (Ballmaier y col., 2007), apoyando la posible implicación del sistema cannabinoide en la esquizofrenia. También se ha postulado que una disfunción glutamatérgica puede tener un papel clave en la patofisiología de esta enfermedad. En ensayos farmacológicos, se ha visto que agonistas del NMDAR mejoran los síntomas negativos de pacientes esquizofrénicos (Goff y Coyle, 2001; Javitt, 2001), mientras que inhibidores como la fenciclidina inducen la aparición de síntomas psicóticos similares a los sufridos en esta enfermedad (Carlsson y col., 2001). Es más, se ha sugerido que la hipofunción del NMDAR provoca una desregulación dopaminérgica en áreas estriatales y de la corteza prefrontal (Harrison y col., 2005; Javitt, 2007). Por tanto, teniendo en cuenta la implicación del NMDAR y de los cannabinoides en esquizofrenia, sugerimos que una estimulación crónica de los CB1Rs podría promover la pérdida persistente del NMDAR en superficie provocando una hipofunción glutamatérgica que, en determinadas circunstancias, podría precipitar la aparición de psicosis.

5. Influencia de la asociación CB1R-NMDAR en la respuesta analgésica a WIN55.212-2. Papel de la proteína HINT1

Los resultados de este trabajo han demostrado la asociación directa de los receptores CB1 con el NMDAR, así como la implicación del módulo HINT1-RGSZ2 en esta interacción. Es por tanto lógico pensar que la asociación entre los receptores y el módulo de señalización pueda influir en la respuesta funcional a la activación por agonista del receptor cannabinoide. En este sentido, decidimos evaluar la analgesia y tolerancia producidas por WIN55.212-2 en animales normales, con expresión reducida de RGSZ2 o carentes de HINT1. Para ello, ya que los ratones KO para RGSZ2 no fueron viables (*KOMP Repository, Universidad de California, Davis*), hemos generado ratones KD para esta proteína mediante un tratamiento subcrónico con ODNs (descrito en el apartado 2.2.1 de material y métodos, página 67). Además, hemos utilizado ratones KO para HINT1 de la cepa 129/SvJ, que presentan un fenotipo normal con respecto a sus congéneres WT.

El receptor CB1 es uno de los GPCRs más abundantes en cerebro, mientras que los CB2R se encuentran localizados en su mayor parte a nivel periférico (Howlett, 1998). Consecuentemente, la activación de los receptores CB1 media la antinocicepción supraespinal cannabinoide (Hohmann y Suplita, 2006; Rea y col., 2007). En nuestro estudio hemos utilizado la vía intracerebroventricular para la administración de WIN55.212-2; esta vía permite que la totalidad de la dosis alcance su lugar de acción a nivel cerebral donde se sabe actúan los cannabinoides que habitualmente se usan por vía inhalatoria, en contraposición a la administración sistémica que no permite diferenciar el tipo de receptor activado, CB1 o CB2, ni que los cannabinoides alcancen tanto ni tan rápidamente los lugares más supraespinales. En todos los grupos de ratones utilizados, el WIN55.212-2 produjo un efecto analgésico dosis dependiente que alcanzó un máximo a los 10 minutos post-inyección. Si bien, la dosis eficaz 50 (EC₅₀) del agonista fue menor en los ratones de la cepa 129/SvJ, tanto WT como KO, que en los CD1.

La tolerancia analgésica que se observa tras la administración intraperitoneal o subcutánea de agonistas cannabinoides requiere inyecciones repetidas de estos compuestos y, como hemos comentado, afecta tanto a receptores CB1 como CB2, a nivel espinal y supraespinal (Elmes y col., 2004; Hohmann y col., 2006). Esta administración a largo plazo de cannabinoides produce la desensibilización y pérdida de los CB1Rs en membrana (Sim-Selley y col., 2006). En particular, la expresión supraespinal de CB1R disminuye y también la capacidad de cannabinoides sistémicos de producir hipoactividad, hipotermia y analgesia (Sim-Selley y col., 2002; Tappe-Theodor y col., 2007; Martini y col., 2007). Se requieren hasta dos semanas para recuperar los niveles iniciales de CB1Rs en las membranas sinaptosomales así como la respuesta analgésica a los cannabinoides (Oviedo y col., 1993; Sim-Selley y col., 2002; Sim-Selley y col., 2006; Tappe-Theodor y col., 2007). Por tanto, la tolerancia analgésica que se desarrolla tras la administración sistémica y repetida de cannabinoides se puede explicar por la pérdida de receptores CB1 en superficie. En este trabajo demostramos que los CB1Rs cerebrales se desensibilizan en respuesta a una sola dosis icv de WIN55.212-2; esta desensibilización tiene una duración similar a la observada tras la administración crónica de cannabinoides, pero no se puede explicar en base a la pérdida de CB1Rs en superficie. La administración de una dosis

aguda de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2 produjo la internalización de los CB1Rs aunque 24 horas después del tratamiento con el cannabinoide los niveles del receptor en membrana eran similares a los observados en ratones no tratados. Además, la activación del receptor CB1 promueve una transferencia limitada y reversible de las proteínas G a la RGSZ2 (Garzón y col., 2009), sin embargo, la tolerancia analgésica se mantiene después de que se recuperen los niveles del receptor en membrana y de su reasociación con las proteínas G.

También estudiamos el papel de la PKC γ en la tolerancia aguda desarrollada a los efectos analgésicos de WIN55.212-2. La PKC γ se ha implicado en la desensibilización de los CB1Rs por fosforilación del residuo de serina 317 del tercer bucle intracelular del receptor (García y col., 1998). Además, el extremo C-terminal del CB1R recluta PKC γ mediante el módulo HINT1-RGSZ2 durante los intervalos en los que el receptor está ya desacoplado de su transducción regulada (Garzón y col., 2009). Sin embargo, la inhibición de la PKC no impidió el desarrollo de tolerancia aguda a WIN55.212-2, a diferencia de lo que ocurre en el caso del MOR activado por morfina, lo que sugiere que otros mecanismos post-receptoriales están implicados en este proceso. El control ineficiente de las proteínas G α por el módulo HINT1-RGSZ2 acoplado al CB1R puede ser la causa de que la desensibilización de los receptores cannabinoides sea tan duradera.

En este sentido, la administración de una dosis aguda de 20 nmol/ratón de WIN55.212-2 en animales KD para RGSZ2 disminuyó el efecto analgésico del cannabinoide desde los primeros 5 minutos post-inyección, reflejando una desensibilización temprana de los efectores regulados por las subunidades G α activadas por el receptor; pero no impidió el desarrollo de una profunda tolerancia aguda a WIN55.212-2. Es de destacar, que en ratones carentes de la proteína HINT1 la tolerancia evocada por una sola dosis de morfina dura tanto como la producida por dosis icv agudas de WIN55.212-2, además, esta tolerancia tampoco responde a inhibidores de PKC y al bloqueo del NMDAR (Rodríguez-Muñoz y col., 2010), lo que indica que la G α alcanza y desacopla a sus efectores. Aunque la morfina no promueve la internalización del MOR, en ratones KO para HINT1 el receptor opioide está desacoplado de RGSZ1/RGSZ2,

reguladores de las G_α, lo que faculta su acción sobre los efectores y así morfina afecta negativamente a la analgesia inducida por WIN55.212-2 (Garzón y col., 2009). Esta desensibilización observada para el CB1R y el MOR en ausencia de HINT1 no revierte al interferir farmacológicamente con la vía NMDAR/CaMKII/nNOS.

En los ratones KO para HINT1 la respuesta analgésica a WIN55.212-2 fue similar a la de sus congéneres WT. La ausencia de HINT1 tampoco impidió el desarrollo de tolerancia analgésica a WIN55.212-2, sin embargo, la analgesia se recuperó mucho antes en los ratones KO (aproximadamente cinco días) que en los WT (dos semanas). Este dato contrasta con lo observado para morfina en los ratones KO para HINT1, en los que el opioide produce una tolerancia que se mantiene más de siete días (Rodríguez-Muñoz y col., 2010). Por tanto, el perfil de tolerancia morfínica en KO para HINT1 se asemeja al obtenido por WIN55.212-2 en ratones WT. Es ciertamente llamativo que en presencia de HINT1 se observa lo contrario, mientras que la tolerancia a morfina dura sobre tres días la de WIN55.212-2 supera las dos semanas. Aunque estas observaciones sugieren un papel de HINT1 en la calidad de la regulación del CB1R sobre su transducción, es necesario ampliar el estudio a fin de precisar el modo en que su pérdida pudiese afectar a la regulación de la G_α.

Por último, se analizó la influencia del NMDAR en la analgesia y tolerancia inducidas por WIN55.212-2. El sistema glutamatérgico se ha implicado en la modulación de la analgesia inducida por cannabinoides. De hecho, se ha visto que la estimulación de mGluRs y del NMDAR es esencial para la producción de analgesia cannabinoide en áreas esenciales para la modulación del dolor, como el PAG (Palazzo y col., 2001; Palazzo y col., 2006). En un estudio previo, observaron que la administración del antagonista de NMDAR, MK-801, atenuaba los efectos analgésicos de un tratamiento agudo con THC, aunque no bloqueaba la tolerancia desarrollada tras la administración repetida de este agonista cannabinoide (Thorat y col., 1994). Nuestros resultados muestran que la activación del NMDAR es necesaria para que se dé la respuesta antinociceptiva a WIN55.212-2. La administración de MK-801 fue capaz de bloquear la analgesia de una dosis aguda de WIN55.212-2 en ratones CD1 y WT para HINT1. Sin embargo, en

ausencia de HINT1, el bloqueo del NMDAR no afectó la respuesta analgésica del cannabinoide, lo que demuestra que la proteína HINT1 está implicada en la modulación de la antinocicepción cannabinoide mediada por el NMDAR y apoya su importancia en la conexión CB1R-NMDAR. Por otra parte, en concordancia con los resultados de Thorat y colaboradores (1994), la inhibición de la actividad del NMDAR por MK-801 no impidió el desarrollo de tolerancia a los efectos antinociceptivos de WIN55.212-2 en ratones WT y KO para HINT1, aunque los KO recuperaron antes la respuesta analgésica.

En resumen, nuestros resultados demuestran que en PAG de ratón los receptores MOR/CB1R y la subunidad NR1 del NMDAR están asociados. Mediante ensayos *in vitro* hemos comprobado que esta interacción es directa, implicando los extremos citosólicos de ambos receptores y también el módulo HINT1-RGSZ. La formación de complejos MOR/CB1R-NMDAR es fundamental en la regulación de la respuesta analgésica opioide y cannabinoide, al tiempo que modula la actividad de los NMDARs. Este estudio supone un avance significativo hacia el mejor entendimiento de la regulación negativa que ejerce el NMDAR sobre la función del MOR, pudiendo ser de gran utilidad para mejorar el tratamiento en casos de dolor resistente a opiáceos, como el dolor neuropático.

Conclusiones

1. Mediante estudios *ex vivo* y estudios *in vitro* hemos demostrado la asociación del receptor opioide Mu con el de glutamato NMDA. Esta asociación tiene lugar en diferentes áreas del sistema nervioso, incluida la sustancia gris periacueductal que se sabe es de relevancia en los efectos analgésicos supraespinales opioides. La asociación física entre ambos receptores tiene lugar mediante secuencias citosólicas C-terminales del MOR y de la subunidad NR1 del NMDA. Esta asociación es relevante desde el punto de vista fisiológico ya que el complejo MOR-NR1 se disocia en respuesta a la activación del MOR o del NMDAR. Morfina induce la separación entre ambos receptores con la ayuda de PKC γ , mientras que la inducida por NMDA requiere de la activación de PKA.
2. En estudios *in vitro* con proteínas recombinantes hemos demostrado que el extremo C-terminal del MOR interacciona directamente con el segmento C1 de las subunidades NR1. El segmento C1 de NR1 contiene el lugar de acción de PKC/PKA y de regulación negativa del NMDAR por Ca²⁺-CaM. La asociación MOR-NR1 C1 se ha observado en células CHO en condiciones que exigen su acoplamiento físico directo, lo que apoya la existencia de este tipo de interacción a nivel fisiológico.
3. En sistema nervioso de ratón hemos observado que el receptor CB1 también se asocia con la subunidad NR1 del NMDAR. *In vitro*, esta asociación es directa y al igual que para otros receptores G, esta unión se establece entre los extremos C-terminales del CB1R y de las subunidades NR1 que portan el segmento C1. La interacción física de ambos receptores en células CHO verifica los resultados obtenidos en los ensayos *ex vivo* e *in vitro*.
4. La activación del receptor cannabinoide por WIN55.212-2 promueve la disociación del complejo CB1R-NMDAR a nivel de membrana, y facilita la endocitosis del receptor cannabinoide y de subunidades NR1. Para que tenga lugar la separación entre ambos receptores es también necesaria la potenciación previa del NMDAR, ya que su bloqueo con MK-801 impide la internalización de los CB1Rs activados. Este fenómeno no se observa en ratones que carecen de la proteína HINT1, lo que sugiere que esta proteína tiene un papel esencial en la conexión CB1-NR1.

5. La proteína HINT1 existe como homodímero *in vivo*. Esta proteína se acopla al segmento C-terminal del MOR y CB1R y desde allí une a la proteína RGSZ2 que a su vez interacciona con la nNOS. HINT1 funciona como proteína de anclaje para la interacción entre el receptor opioide Mu y la RGSZ2; sin embargo, el extremo C-terminal del receptor CB1 es capaz de interaccionar directamente con ambos componentes del módulo, HINT1 y RGSZ2. El complejo HINT1-RGSZ2 se disocia en presencia de PKC γ y subunidades G α i2/z activadas.
6. La activación del receptor NMDA es necesaria para que tenga lugar el efecto analgésico del WIN55.212-2. Así, el bloqueo de este receptor por MK-801 conduce a una reducción muy acusada de la respuesta analgésica a los agonistas cannabinoides CB1R. Sin embargo, en ausencia de la proteína HINT1 el bloqueo del NMDAR no afecta la analgesia cannabinoide. Estos resultados indican que la proteína HINT1 es esencial para que la conexión CB1R-NMDAR sea operativa.
7. La administración icv de una dosis adecuada de WIN55.212-2 produce la desensibilización de los receptores CB1 por un período de dos semanas. La reducción de la proteína reguladora RGSZ2 o de la HINT1 no altera este proceso de tolerancia al WIN55.212-2. Sin embargo, los ratones carentes de HINT1 recuperan la respuesta analgésica al cannabinoide mucho antes que sus congéneres *wild type*. Por tanto, la presencia de HINT1 conecta al CB1R con el NMDAR dando origen a los mecanismos post-receptoriales que causan la desensibilización a largo plazo de los CB1R.
8. Este estudio demuestra la asociación del MOR y del CB1R con el receptor de glutamato NMDA. La existencia de esta asociación nos ayuda a entender los procesos de regulación cruzada existentes entre receptores G y de NMDA. Procesos que influyen decisivamente en la intensidad y duración de los efectos inducidos por morfina y WIN55.212-2. Asimismo, nuestro estudio ha demostrado la importancia del módulo HINT1-RGSZ2-nNOS en esta regulación.

Bibliografia

- Abdelhamid, E. E., Sultana, M., Portoghese, P. S. y Takemori, A. E. (1991). Selective blockage of delta opioid receptors prevents the development of morphine tolerance and dependence in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 258, 299-303.
- Abood, M. E. y Martin, B. R. (1992). Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol.Sci.*, 13, 201-206.
- Ahel, I., Rass, U., El-Khamisy, S. F., Katyal, S., Clements, P. M., McKinnon, P. J. y col. (2006). The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*, 443, 713-716.
- Aicher, S. A., Goldberg, A., Sharma, S. y Pickel, V. M. (2000). Mu-opioid receptors are present in vagal afferents and their dendritic targets in the medial nucleus tractus solitarius. *J.Comp Neurol.*, 422, 181-190.
- Ajit, S. K., Ramineni, S., Edris, W., Hunt, R. A., Hum, W. T., Hepler, J. R. y col. (2007). RGSZ1 interacts with protein kinase C interacting protein PKCI-1 and modulates mu opioid receptor signaling. *Cell Signal.*, 19, 723-730.
- Akil, H., Mayer, D. J. y Liebeskind, J. C. (1976). Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science*, 191, 961-962.
- Akil, H., Mayer, D. J. y Liebeskind, J. C. (1972). Comparison in the rat between analgesia induced by stimulation of periaqueductal gray matter and morphine analgesia. *C.R.Acad.Sci.Hebd.Seances Acad.Sci.D.*, 274, 3603-3605.
- Akil, H., Owens, C., Gutstein, H., Taylor, L., Curran, E. y Watson, S. (1998). Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend.*, 51, 127-140.
- Alagarsamy, S., Rouse, S. T., Junge, C., Hubert, G. W., Gutman, D., Smith, Y. y col. (2002). NMDA-induced phosphorylation and regulation of mGluR5. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 73, 299-306.
- Albert, P. R. y Robillard, L. (2002). G protein specificity: traffic direction required. *Cell Signal.*, 14, 407-418.
- Allen, P. B., Hvalby, O., Jensen, V., Errington, M. L., Ramsay, M., Chaudhry, F. A. y col. (2000). Protein phosphatase-1 regulation in the induction of long-term potentiation: heterogeneous molecular mechanisms. *J.Neurosci.*, 20, 3537-3543.
- Antonelli, T., Tomasini, M. C., Tattoli, M., Cassano, T., Tanganelli, S., Finetti, S. y col. (2005). Prenatal exposure to the CB1 receptor agonist WIN 55,212-2 causes learning disruption associated with impaired cortical NMDA receptor function and emotional reactivity changes in rat offspring. *Cereb.Cortex*, 15, 2013-2020.
- Arden, J. R., Segredo, V., Wang, Z., Lameh, J. y Sadee, W. (1995). Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells. *J.Neurochem.*, 65, 1636-1645.
- Arvidsson, U., Riedl, M., Chakrabarti, S., Lee, J. H., Nakano, A. H., Dado, R. J. y col. (1995). Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J.Neurosci.*, 15, 3328-3341.

- Ashton, J. C. y Milligan, E. D. (2008). Cannabinoids for the treatment of neuropathic pain: clinical evidence. *Curr.Opin.Investig.Drugs*, 9, 65-75.
- Augustin, L. B., Felsheim, R. F., Min, B. H., Fuchs, S. M., Fuchs, J. A. y Loh, H. H. (1995). Genomic structure of the mouse delta opioid receptor gene. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 207, 111-119.
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W. L. y Hiley, C. R. (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol.Sci.*, 27, 1-4.
- Ballmaier, M., Bortolato, M., Rizzetti, C., Zoli, M., Gessa, G., Heinz, A. y col. (2007). Cannabinoid receptor antagonists counteract sensorimotor gating deficits in the phencyclidine model of psychosis. *Neuropsychopharmacology*, 32, 2098-2107.
- Barbier, E. y Wang, J. B. (2009). Anti-depressant and anxiolytic like behaviors in PKCI/HINT1 knockout mice associated with elevated plasma corticosterone level. *BMC.Neurosci.*, 10, 132.
- Barbier, E., Zapata, A., Oh, E., Liu, Q., Zhu, F., Undie, A. y col. (2007). Supersensitivity to Amphetamine in Protein Kinase-C Interacting Protein//HINT1 Knockout Mice. *Neuropsychopharmacology*, 32, 1774-1782.
- Barker, S. A., Wang, J., Sierra, D. A. y Ross, E. M. (2001). RGSZ1 and Ret RGS: two of several splice variants from the gene RGS20. *Genomics*, 78, 223-229.
- Bear, M. F. y Malenka, R. C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 4, 389-399.
- Beattie, E. C., Carroll, R. C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von, Z. M. y col. (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat.Neurosci.*, 3, 1291-1300.
- Beckett A.H y Casy A.F. (1954). Synthetic analgesics: stereochemical considerations. *J.Pharm.Pharmacol.*, 6, 986-1001.
- Benovic, J. L., Pike, L. J., Cerione, R. A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J. y col. (1985). Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J.biol.Chem.*, 260, 7094-7101.
- Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1986). Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 83, 2797-2801.
- Benquet, P., Gee, C. E. y Gerber, U. (2002). Two distinct signaling pathways upregulate NMDA receptor responses via two distinct metabotropic glutamate receptor subtypes. *J.Neurosci.*, 22, 9679-9686.
- Berman, D. M., Kozasa, T. y Gilman, A. G. (1996). The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. *J.biol.Chem.*, 271, 27209-27212.

- Bilsky, E. J., Inturrisi, C. E., Sadee, W., Hruby, V. J. y Porreca, F. (1996). Competitive and non-competitive NMDA antagonists block the development of antinociceptive tolerance to morphine, but not to selective mu or delta opioid agonists in mice. *Pain*, 68, 229-237.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523.
- Biscaia, M., Marín, S., Fernández, B., Marco, E. M., Rubio, M., Guaza, C. y col. (2003). Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)*, 170, 301-308.
- Blank, T., Nijholt, I., Teichert, U., Kugler, H., Behrsing, H., Fienberg, A. y col. (1997). The phosphoprotein DARPP-32 mediates cAMP-dependent potentiation of striatal N-methyl-D-aspartate responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94, 14859-14864.
- Bleakman, D., Alt, A. y Nisenbaum, E. S. (2006). Glutamate receptors and pain. *Semin.Cell Dev.Biol.*, 17, 592-604.
- Blitzer, R. D., Connor, J. H., Brown, G. P., Wong, T., Shenolikar, S., Iyengar, R. y col. (1998). Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science*, 280, 1940-1942.
- Bonnot, A., Corio, M., Tramu, G. y Viala, D. (1996). Immunocytochemical distribution of ionotropic glutamate receptor subunits in the spinal cord of the rabbit. *J.Chem.Neuroanat.*, 11, 267-278.
- Bouaboula, M., Bourrie, B., Rinaldi-Carmona, M., Shire, D., Le Fur, G. y Casellas, P. (1995a). Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J.biol.Chem.*, 270, 13973-13980.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M. y col. (1995b). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem.J*, 312 (Pt 2), 637-641.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Marchand, J., Canat, X., Bourrie, B., Rinaldi-Carmona, M. y col. (1996). Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur.J Biochem.*, 237, 704-711.
- Bradshaw, J. M., Kubota, Y., Meyer, T. y Schulman, H. (2003). An ultrasensitive Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II-protein phosphatase 1 switch facilitates specificity in postsynaptic calcium signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 10512-10517.
- Breivogel, C. S., Childers, S. R., Deadwyler, S. A., Hampson, R. E., Vogt, L. J. y Sim-Selley, L. J. (1999). Chronic delta9-tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain. *J Neurochem.*, 73, 2447-2459.

Breivogel, C. S., Griffin, G., Di Marzo, V. y Martin, B. R. (2001). Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol.Pharmacol.*, 60, 155-163.

Brenner, C. (2002). Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry*, 41, 9003-9014.

Bridges, D., Ahmad, K. y Rice, A. S. (2001). The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Br.J.Pharmacol.*, 133, 586-594.

Brothwell, S. L., Barber, J. L., Monaghan, D. T., Jane, D. E., Gibb, A. J. y Jones, S. (2008). NR2B- and NR2D-containing synaptic NMDA receptors in developing rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones. *J.Physiol*, 586, 739-750.

Brown, T. M., Brotchie, J. M. y Fitzjohn, S. M. (2003). Cannabinoids decrease corticostriatal synaptic transmission via an effect on glutamate uptake. *J.Neurosci.*, 23, 11073-11077.

Brusco, A., Tagliaferro, P., Saez, T. y Onaivi, E. S. (2008). Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse*, 62, 944-949.

Cabral, G. A., Harmon, K. N. y Carlisle, S. J. (2001). Cannabinoid-mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat microglial cells: evidence for CB1 receptor participation. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 493, 207-214.

Cannon, J. T., Prieto, G. J., Lee, A. y Liebeskind, J. C. (1982). Evidence for opioid and non-opioid forms of stimulation-produced analgesia in the rat. *Brain Res.*, 243, 315-321.

Cannon, M. y Clarke, M. C. (2005). Risk for schizophrenia- broadening the concepts, pushing back the boundaries. *Schizophr.Res*, 79, 5-13.

Cao, J., Viholainen, J. I., Dart, C., Warwick, H. K., Leyland, M. L. y Courtney, M. J. (2005). The PSD95-nNOS interface: a target for inhibition of excitotoxic p38 stress-activated protein kinase activation and cell death. *J.Cell Biol.*, 168, 117-126.

Carlsson, A., Waters, N., Holm-Waters, S., Tedroff, J., Nilsson, M. y Carlsson, M. L. (2001). Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 41, 237-260.

Casey, P. J., Fong, H. K., Simon, M. I. y Gilman, A. G. (1990). Gz, a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties. *J.biol.Chem.*, 265, 2383-2390.

Castanas, E., Giraud, P., Bourhim, N., Cantau, P. y Oliver, C. (1984). Kappa 3: a novel subtype of the kappa opioid site in bovine adrenal medulla, highly selective for Met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷. *Neuropeptides*, 5, 133-136.

Castillo, J. (2000). Physiopathology of cerebral ischemia. *Rev.Neurol.*, 30, 459-464.

Caulfield, M. P. y Brown, D. A. (1992). Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br.J Pharmacol.*, 106, 231-232.

- Celver, J., Xu, M., Jin, W., Lowe, J. y Chavkin, C. (2004). Distinct domains of the mu-opioid receptor control uncoupling and internalization. *Mol.Pharmacol.*, 65, 528-537.
- Chakravarthy, B., Morley, P. y Whitfield, J. (1999). Ca^{2+} -calmodulin and protein kinase Cs: a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains. *Trends Neurosci.*, 22, 12-16.
- Chan, J. S., Chiu, T. T. y Wong, Y. H. (1995). Activation of type II adenylyl cyclase by the cloned mu-opioid receptor: coupling to multiple G proteins. *J.Neurochem.*, 65, 2682-2689.
- Chapman, V., Haley, J. E. y Dickenson, A. H. (1994). Electrophysiologic analysis of preemptive effects of spinal opioids on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated events. *Anesthesiology*, 81, 1429-1435.
- Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y. y col. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, 415, 793-798.
- Chavkin, C., McLaughlin, J. P. y Celver, J. P. (2001). Regulation of opioid receptor function by chronic agonist exposure: constitutive activity and desensitization. *Mol.Pharmacol.*, 60, 20-25.
- Chazot, P. L. y Stephenson, F. A. (1997). Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. *J.Neurochem.*, 69, 2138-2144.
- Chen, B. S. y Roche, K. W. (2007). Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology*, 53, 362-368.
- Chen, J., Lee, C. T., Errico, S., Deng, X., Cadet, J. L. y Freed, W. J. (2005). Protective effects of delta9-tetrahydrocannabinol against N-methyl-d-aspartate-induced AF5 cell death. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, 134, 215-225.
- Chen, L. y Huang, L. Y. (1991). Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid. *Neuron*, 7, 319-326.
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J. A. y Yu, L. (1993). Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol.Pharmacol.*, 44, 8-12.
- Cichewicz, D. L., Martin, Z. L., Smith, F. L. y Welch, S. P. (1999). Enhancement mu opioid antinociception by oral delta9-tetrahydrocannabinol: dose-response analysis and receptor identification. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 289, 859-867.
- Cichewicz, D. L. y McCarthy, E. A. (2003). Antinociceptive synergy between delta(9)-tetrahydrocannabinol and opioids after oral administration. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 304, 1010-1015.

Clark, J. A., Liu, L., Price, M., Hersh, B., Edelson, M. y Pasternak, G. W. (1989). Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two U50,488-sensitive kappa 1 subtypes and a novel kappa 3 subtype. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 251, 461-468.

Colwell, C. S. y Levine, M. S. (1995). Excitatory synaptic transmission in neostriatal neurons: regulation by cyclic AMP-dependent mechanisms. *J.Neurosci.*, 15, 1704-1713.

Commons, K. G., Van Bockstaele, E. J. y Pfaff, D. W. (1999). Frequent colocalization of mu opioid and NMDA-type glutamate receptors at postsynaptic sites in periaqueductal gray neurons. *J.Comp Neurol.*, 408, 549-559.

Costa, B., Colleoni, M., Conti, S., Trovato, A. E., Bianchi, M., Sotgiu, M. L. y col. (2004). Repeated treatment with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 reduces both hyperalgesia and production of pronociceptive mediators in a rat model of neuropathic pain. *Br.J.Pharmacol.*, 141, 4-8.

Cox, B. M., Goldstein, A. y Hi, C. H. (1976). Opioid activity of a peptide, beta-lipotropin-(61-91), derived from beta-lipotropin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 73, 1821-1823.

Crump, F. T., Dillman, K. S. y Craig, A. M. (2001). cAMP-dependent protein kinase mediates activity-regulated synaptic targeting of NMDA receptors. *J.Neurosci.*, 21, 5079-5088.

Daigle, T. L., Kwok, M. L. y Mackie, K. (2008). Regulation of CB1 cannabinoid receptor internalization by a promiscuous phosphorylation-dependent mechanism. *J.Neurochem.*, 106, 70-82.

Dannert, M. T., Alsasua, A., Herradón, E., Martín, M. I. y López-Miranda, V. (2007). Vasorelaxant effect of Win 55,212-2 in rat aorta: new mechanisms involved. *Vascul.Pharmacol.*, 46, 16-23.

De Vries L., Elenko, E., Hubler, L., Jones, T. L. y Farquhar, M. G. (1996). GAIP is membrane-anchored by palmitoylation and interacts with the activated (GTP-bound) form of G alpha i subunits. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 15203-15208.

Degenhardt, L., Hall, W. y Lynskey, M. (2003). Testing hypotheses about the relationship between cannabis use and psychosis. *Drug Alcohol Depend.*, 71, 37-48.

Devane, W. A., Dysarz, F. A., III, Johnson, M. R., Melvin, L. S. y Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol.Pharmacol.*, 34, 605-613.

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G. y col. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946-1949.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. y Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol.Rev.*, 51, 7-61.

Dingledine, R. y Conn, P. J. (2000). Peripheral glutamate receptors: molecular biology and role in taste sensation. *J.Nutr.*, 130, 1039S-1042S.

- Dohrn, C. S. y Beitz, A. J. (1994). Differential NMDA NR1 mRNA expression among spinal trigeminal neurons that project to different targets. *Neuroreport*, 5, 1857-1860.
- Dosemeci, A., Tao-Cheng, J. H., Vinade, L., Winters, C. A., Pozzo-Miller, L. y Reese, T. S. (2001). Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98, 10428-10432.
- Doupnik, C. A., Xu, T. y Shinaman, J. M. (2001). Profile of RGS expression in single rat atrial myocytes. *Biochim.Biophys.Acta*, 1522, 97-107.
- Dunah, A. W., Sirianni, A. C., Fienberg, A. A., Bastia, E., Schwarzschild, M. A. y Standaert, D. G. (2004). Dopamine D1-dependent trafficking of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors requires Fyn protein tyrosine kinase but not DARPP-32. *Mol.Pharmacol.*, 65, 121-129.
- Dunah, A. W. y Standaert, D. G. (2003). Subcellular segregation of distinct heteromeric NMDA glutamate receptors in the striatum. *J.Neurochem.*, 85, 935-943.
- Durand, G. M., Bennett, M. V. y Zukin, R. S. (1993). Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 90, 6731-6735.
- Dykstra, L. A., Fischer, B. D., Balter, R. E., Henry, F. E., Schmidt, K. T. y Miller, L. L. (2011). Opioid antinociception, tolerance and dependence: interactions with the N-methyl-D-aspartate system in mice. *Behav.Pharmacol.*, 22, 540-547.
- Egertova, M. y Elphick, M. R. (2000). Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol.*, 422, 159-171.
- Egertova, M., Giang, D. K., Cravatt, B. F. y Elphick, M. R. (1998). A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc.Biol.Sci.*, 265, 2081-2085.
- Ehlers, M. D., Fung, E. T., O'Brien, R. J. y Huganir, R. L. (1998). Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *J.Neurosci.*, 18, 720-730.
- Ehlers, M. D., Zhang, S., Bernhardt, J. P. y Huganir, R. L. (1996). Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell*, 84, 745-755.
- El Kouhen, R., Burd, A. L., Erickson-Herbrandson, L. J., Chang, C. Y., Law, P. Y. y Loh, H. H. (2001). Phosphorylation of Ser363, Thr370, and Ser375 residues within the carboxyl tail differentially regulates mu-opioid receptor internalization. *J.biol.Chem.*, 276, 12774-12780.
- Elashoff, M., Higgs, B. W., Yolken, R. H., Knable, M. B., Weis, S., Webster, M. J. y col. (2007). Meta-analysis of 12 genomic studies in bipolar disorder. *J.Mol.Neurosci.*, 31, 221-243.
- Elmes, S. J., Jhaveri, M. D., Smart, D., Kendall, D. A. y Chapman, V. (2004). Cannabinoid CB2 receptor activation inhibits mechanically evoked responses of wide

dynamic range dorsal horn neurons in naive rats and in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Eur.J.Neurosci.*, 20, 2311-2320.

Evanko, D. S., Thiyagarajan, M. M., Siderovski, D. P. y Wedegaertner, P. B. (2001). Gbeta gamma isoforms selectively rescue plasma membrane localization and palmitoylation of mutant Galphas and Galphaq. *J.biol.Chem.*, 276, 23945-23953.

Evans, C. J., Keith, D. E., Jr., Morrison, H., Magendzo, K. y Edwards, R. H. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, 258, 1952-1955.

Fan, N., Yang, H., Zhang, J. y Chen, C. (2010). Reduced expression of glutamate receptors and phosphorylation of CREB are responsible for in vivo Delta9-THC exposure-impaired hippocampal synaptic plasticity. *J.Neurochem.*, 112, 691-702.

Faux, M. C. y Scott, J. D. (1997). Regulation of the AKAP79-protein kinase C interaction by Ca^{2+} /Calmodulin. *J.biol.Chem.*, 272, 17038-17044.

Faux, M. C. y Scott, J. D. (1996). Molecular glue: kinase anchoring and scaffold proteins. *Cell*, 85, 9-12.

Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O. y col. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol.Pharmacol.*, 48, 443-450.

Ferguson, S. S., Zhang, J., Barak, L. S. y Caron, M. G. (1998). Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci.*, 62, 1561-1565.

Fernández-Espejo, E. y Galán-Rodríguez, B. (2004). Sensorimotor gating in mice is disrupted after AM404, an anandamide reuptake and degradation inhibitor. *Psychopharmacology (Berl)*, 175, 220-224.

Fernández-Espejo, E., Viveros, M. P., Núñez, L., Ellenbroek, B. A. y Rodríguez de Fonseca, F. (2009). Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*, 206, 531-549.

Ferraro, L., Tomasini, M. C., Gessa, G. L., Bebe, B. W., Tanganelli, S. y Antonelli, T. (2001). The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 regulates glutamate transmission in rat cerebral cortex: an in vivo and in vitro study. *Cereb.Cortex*, 11, 728-733.

Finn, A. K. y Whistler, J. L. (2001). Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. *Neuron*, 32, 829-839.

Finn, D. P., Jhaveri, M. D., Beckett, S. R., Roe, C. H., Kendall, D. A., Marsden, C. A. y col. (2003). Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. *Neuropharmacology*, 45, 594-604.

Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P., Di Luca, M. y Missale, C. (2003). Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *J.biol.Chem.*, 278, 20196-20202.

- Fischer, T., De Vries, L., Meerloo, T. y Farquhar, M. G. (2003). Promotion of G alpha i3 subunit down-regulation by GIPN, a putative E3 ubiquitin ligase that interacts with RGS-GAIP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 8270-8275.
- Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A. y col. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J.Neurophysiol.*, 88, 3010-3020.
- Fox, A., Kesingland, A., Gentry, C., McNair, K., Patel, S., Urban, L. y col. (2001). The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain*, 92, 91-100.
- Frangioni, J. V. y Neel, B. G. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal.Biochem.*, 210, 179-187.
- Fraser, I. D. y Scott, J. D. (1999). Modulation of ion channels: a "current" view of AKAPs. *Neuron*, 23, 423-426.
- Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K. y Inokuchi, K. (2003). Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron*, 38, 447-460.
- Fukuda, K., Kato, S., Mori, K., Nishi, M., Takeshima, H., Iwabe, N. y col. (1994). cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett.*, 343, 42-46.
- Fundytus, M. E., Schiller, P. W., Shapiro, M., Weltrowska, G. y Coderre, T. J. (1995). Attenuation of morphine tolerance and dependence with the highly selective delta-opioid receptor antagonist TIPP[psi]. *Eur.J.Pharmacol.*, 286, 105-108.
- Funke, L., Dakoji, S. y Bredt, D. S. (2005). Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu.Rev.Biochem.*, 74, 219-245.
- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R. y Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438, 185-192.
- Gagliardi, R. J. (2000). Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. *Arq Neuropsiquiatr.*, 58, 583-588.
- Gaoni, Y. y Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J.Am.Chem.Soc.*, 86, 1646-1647.
- García, D. E., Brown, S., Hille, B. y Mackie, K. (1998). Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor. *J.Neurosci.*, 18, 2834-2841.
- Gardoni, F., Schrama, L. H., van Dalen, J. J., Gispen, W. H., Cattabeni, F. y Di Luca, M. (1999). AlphaCaMKII binding to the C-terminal tail of NMDA receptor subunit NR2A and its modulation by autophosphorylation. *FEBS Lett.*, 456, 394-398.

Garzón, J., Castro, M. y Sánchez-Blázquez, P. (1998). Influence of G α and G α 2 transducer proteins in the affinity of opioid agonists to mu receptors. *Eur.J Neurosci.*, 10, 2557-2564.

Garzón, J., de la Torre-Madrid, E., Rodríguez-Muñoz, M., Vicente-Sánchez, A. y Sánchez-Blázquez, P. (2009). G α mediates the long-lasting desensitization of brain CB1 receptors and is essential for cross-tolerance with morphine. *Mol.Pain*, 5, 11.

Garzón, J., García-España, A. y Sánchez-Blázquez, P. (1997). Opioids binding mu and delta receptors exhibit diverse efficacy in the activation of G α 2 and G(x/z) transducer proteins in mouse periaqueductal gray matter. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 281, 549-557.

Garzón, J., López-Fando, A. y Sánchez-Blázquez, P. (2003). The R7 subfamily of RGS proteins assists tachyphylaxis and acute tolerance at mu-opioid receptors. *Neuropsychopharmacology*, 28, 1983-1990.

Garzón, J., Rodríguez-Díaz, M., López-Fando, A., García-España, A. y Sánchez-Blázquez, P. (2002). Glycosylated phosducin-like protein long regulates opioid receptor function in mouse brain. *Neuropharmacology*, 42, 813-828.

Garzón, J., Rodríguez-Díaz, M., López-Fando, A. y Sánchez-Blázquez, P. (2001). RGS9 proteins facilitate acute tolerance to mu-opioid effects. *Eur.J.Neurosci.*, 13, 801-811.

Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E. y Sánchez-Blázquez, P. (2005a). Effector antagonism by the regulators of G protein signalling (RGS) proteins causes desensitization of mu-opioid receptors in the CNS. *Psychopharmacology (Berl)*, 180, 1-11.

Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M., López-Fando, A., García-España, A. y Sánchez-Blázquez, P. (2004). RGSZ1 and GAIP regulate mu- but not delta-opioid receptors in mouse CNS: role in tachyphylaxis and acute tolerance. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1091-1104.

Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M., López-Fando, A. y Sánchez-Blázquez, P. (2005b). Activation of mu-opioid receptors transfers control of G α subunits to the regulator of G-protein signaling RGS9-2: role in receptor desensitization. *J.biol.Chem.*, 280, 8951-8960.

Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M., López-Fando, A. y Sánchez-Blázquez, P. (2005c). The RGSZ2 protein exists in a complex with mu-opioid receptors and regulates the desensitizing capacity of G α proteins. *Neuropsychopharmacology*, 30, 1632-1648.

Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M. y Sánchez-Blázquez, P. (2005d). Morphine alters the selective association between mu-opioid receptors and specific RGS proteins in mouse periaqueductal gray matter. *Neuropharmacology*, 48, 853-868.

Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M. y Sánchez-Blázquez, P. (2008). Do pharmacological approaches that prevent opioid tolerance target different elements in the same regulatory machinery? *Curr.Drug Abuse Rev.*, 1, 222-238.

Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M., Vicente-Sánchez, A., Bailón, C., Martínez-Murillo, R. y Sánchez-Blázquez, P. (2011a). RGSZ2 binds to the neural nitric oxide synthase PDZ domain to regulate mu-opioid receptor-mediated potentiation of the N-methyl-D-aspartate

receptor-calmodulin-dependent protein kinase II pathway. *Antioxid.Redox.Signal.*, 15, 873-887.

Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M., Vicente-Sánchez, A., García-López, M. A., Martínez-Murillo, R., Fischer, T. y col. (2011b). SUMO-SIM interactions regulate the activity of RGSZ2 proteins. *PLoS.One.*, 6, e28557.

Garzón, J., Sánchez-Blázquez, P., Holtt, V., Lee, N. M. y Loh, H. H. (1983). Endogenous opioid peptides: comparative evaluation of their receptor affinities in the mouse brain. *Life Sci.*, 33 Suppl 1, 291-294.

Gaudet, R., Savage, J. R., McLaughlin, J. N., Willardson, B. M. y Sigler, P. B. (1999). A molecular mechanism for the phosphorylation-dependent regulation of heterotrimeric G proteins by phosducin. *Mol.Cell*, 3, 649-660.

Gerard, C. M., Mollereau, C., Vassart, G. y Parmentier, M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem.J.*, 279 (Pt 1), 129-134.

Gerdeman, G. y Lovinger, D. M. (2001). CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol.*, 85, 468-471.

Gerendasy, D. D. y Sutcliffe, J. G. (1997). RC3/neurogranin, a postsynaptic calpacitin for setting the response threshold to calcium influxes. *Mol.Neurobiol.*, 15, 131-163.

Ghalandari-Shamami, M., Hassanpour-Ezatti, M. y Haghparast, A. (2011). Intra-accumbal NMDA but not AMPA/kainate receptor antagonist attenuates WIN55,212-2 cannabinoid receptor agonist-induced antinociception in the basolateral amygdala in a rat model of acute pain. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 100, 213-219.

Ghosh, I., Hamilton, A. D. y Regan, L. (2000). Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein. *Journal of the American Chemical Society*, 122, 5658-5659.

Gillardon, F., Beck, H., Uhlmann, E., Herdegen, T., Sandkuhler, J., Peyman, A. y col. (1994). Inhibition of c-Fos protein expression in rat spinal cord by antisense oligodeoxynucleotide superfusion. *Eur.J Neurosci.*, 6, 880-884.

Gintzler, A. R. y Pasternak, G. W. (1983). Multiple mu receptors: evidence for mu2 sites in the guinea pig ileum. *Neurosci.Lett.*, 39, 51-56.

Glass, M. J., Vanyo, L., Quimson, L. y Pickel, V. M. (2009). Ultrastructural relationship between N-methyl-D-aspartate-NR1 receptor subunit and mu-opioid receptor in the mouse central nucleus of the amygdala. *Neuroscience*, 163, 857-867.

Goff, D. C. y Coyle, J. T. (2001). The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am.J.Psychiatry*, 158, 1367-1377.

Gong, J. P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q. R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A. y col. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.*, 1071, 10-23.

Gracy, K. N., Svingos, A. L. y Pickel, V. M. (1997). Dual ultrastructural localization of mu-opioid receptors and NMDA-type glutamate receptors in the shell of the rat nucleus accumbens. *J.Neurosci.*, 17, 4839-4848.

Granados-Soto, V., Kalcheva, I., Hua, X., Newton, A. y Yaksh, T. L. (2000). Spinal PKC activity and expression: role in tolerance produced by continuous spinal morphine infusion. *Pain*, 85, 395-404.

Grosshans, D. R. y Browning, M. D. (2001). Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. *J.Neurochem.*, 76, 737-744.

Guang, W., Wang, H., Su, T., Weinstein, I. B. y Wang, J. B. (2004). Role of mPKCI, a novel mu-opioid receptor interactive protein, in receptor desensitization, phosphorylation, and morphine-induced analgesia. *Mol.Pharmacol.*, 66, 1285-1292.

Guindon, J. y Beaulieu, P. (2006). Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology*, 50, 814-823.

Hajos, N., Katona, I., Naiem, S. S., Mackie, K., Ledent, C., Mody, I. y col. (2000). Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur.J Neurosci.*, 12, 3239-3249.

Hajos, N., Ledent, C. y Freund, T. F. (2001). Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience*, 106, 1-4.

Hampson, R. E., Miller, F., Palchik, G. y Deadwyler, S. A. (2011). Cannabinoid receptor activation modifies NMDA receptor mediated release of intracellular calcium: implications for endocannabinoid control of hippocampal neural plasticity. *Neuropharmacology*, 60, 944-952.

Harada, Y., Nishioka, K., Kitahata, L. M., Nakatani, K. y Collins, J. G. (1995). Contrasting actions of intrathecal U50,488H, morphine, or [D-Pen², D-Pen⁵] enkephalin or intravenous U50,488H on the visceromotor response to colorectal distension in the rat. *Anesthesiology*, 83, 336-343.

Harrison, P. J. y Weinberger, D. R. (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol.Psychiatry*, 10, 40-68.

Hatton, C. J. y Paoletti, P. (2005). Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron*, 46, 261-274.

Hawes, B. E., Touhara, K., Kurose, H., Lefkowitz, R. J. y Inglese, J. (1994). Determination of the G beta gamma-binding domain of phosducin. A regulatable modulator of G beta gamma signaling. *J.biol.Chem.*, 269, 29825-29830.

Heinricher, M. M., Schouten, J. C. y Jobst, E. E. (2001). Activation of brainstem N-methyl-D-aspartate receptors is required for the analgesic actions of morphine given systemically. *Pain*, 92, 129-138.

- Hepler, J. R., Berman, D. M., Gilman, A. G. y Kozasa, T. (1997). RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq alpha and block activation of phospholipase C beta by gamma-thio-GTP-Gq alpha. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94, 428-432.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., De Costa, B. R. y Rice, K. C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J.Neurosci.*, 11, 563-583.
- Herzberg, U., Eliav, E., Bennett, G. J. y Kopin, I. J. (1997). The analgesic effects of R(+)-WIN 55,212-2 mesylate, a high affinity cannabinoid agonist, in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci.Lett.*, 221, 157-160.
- Hisatsune, C., Umemori, H., Inoue, T., Michikawa, T., Kohda, K., Mikoshiba, K. y col. (1997). Phosphorylation-dependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by calmodulin. *J.biol.Chem.*, 272, 20805-20810.
- Hohmann, A. G. (2002). Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem.Phys.Lipids*, 121, 173-190.
- Hohmann, A. G., Briley, E. M. y Herkenham, M. (1999). Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res.*, 822, 17-25.
- Hohmann, A. G. y Suplita, R. L. (2006). Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS.J.*, 8, E693-E708.
- Hollinger, S. y Hepler, J. R. (2002). Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol.Rev.*, 54, 527-559.
- Hollister, L. E. (1974). Structure-activity relationships in man of cannabis constituents, and homologs and metabolites of delta9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacology.*, 11, 3-11.
- Hollister, L. E. (1986). Health aspects of cannabis. *Pharmacol.Rev.*, 38, 1-20.
- Howlett, A. C. (1998). The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol.Dis.*, 5, 405-416.
- Hsieh, C., Brown, S., Derleth, C. y Mackie, K. (1999). Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem.*, 73, 493-501.
- Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. A., Morgan, B. A. y Morris, H. R. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258, 577-580.
- Huidobro, F., Huidobro-Toro, J. P. y Leong, W. E. (1976). Studies on tolerance development to single doses of morphine in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 198, 318-329.
- Hull, L. C., Llorente, J., Gabra, B. H., Smith, F. L., Kelly, E., Bailey, C. y col. (2010). The effect of protein kinase C and G protein-coupled receptor kinase inhibition on tolerance induced by mu-opioid agonists of different efficacy. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 332, 1127-1135.

- Humrich, J., Bermel, C., Bunemann, M., Harmark, L., Frost, R., Quitterer, U. y col. (2005). Phosducin-like protein regulates G-protein betagamma folding by interaction with tailless complex polypeptide-1alpha: dephosphorylation or splicing of PhLP turns the switch toward regulation of Gbetagamma folding. *J.biol.Chem.*, 280, 20042-20050.
- Hunt, T. W., Fields, T. A., Casey, P. J. y Peralta, E. G. (1996). RGS10 is a selective activator of G alpha i GTPase activity. *Nature*, 383, 175-177.
- Husi, H. y Grant, S. G. (2001). Proteomics of the nervous system. *Trends Neurosci.*, 24, 259-266.
- Husi, H., Ward, M. A., Choudhary, J. S., Blackstock, W. P. y Grant, S. G. (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat.Neurosci.*, 3, 661-669.
- Hutcheson, D. M., Tzavara, E. T., Smadja, C., Valjent, E., Roques, B. P., Hanoune, J. y col. (1998). Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br.J.Pharmacol.*, 125, 1567-1577.
- Inoue, M., Mishina, M. y Ueda, H. (2003). Locus-specific rescue of GluRepsilon1 NMDA receptors in mutant mice identifies the brain regions important for morphine tolerance and dependence. *J.Neurosci.*, 23, 6529-6536.
- Isaac, J. (2001). Protein phosphatase 1 and LTD: synapses are the architects of depression. *Neuron*, 32, 963-966.
- Iversen, L. y Chapman, V. (2002). Cannabinoids: a real prospect for pain relief? *Curr.Opin.Pharmacol.*, 2, 50-55.
- Javitt, D. C. (2007). Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int.Rev.Neurobiol.*, 78, 69-108.
- Javitt, D. C. (2001). Management of negative symptoms of schizophrenia. *Curr.Psychiatry Rep.*, 3, 413-417.
- Jiang, Q., Takemori, A. E., Sultana, M., Portoghese, P. S., Bowen, W. D., Mosberg, H. I. y col. (1991). Differential antagonism of opioid delta antinociception by [D-Ala2,Leu5,Cys6]enkephalin and naltrindole 5'-isothiocyanate: evidence for delta receptor subtypes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 257, 1069-1075.
- Jin, W., Brown, S., Roche, J. P., Hsieh, C., Celver, J. P., Koo, A. y col. (1999). Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J Neurosci.*, 19, 3773-3780.
- Johnson, J. W. (2003). Acid tests of N-methyl-D-aspartate receptor gating basics. *Mol.Pharmacol.*, 63, 1199-1201.
- Jones, G., Pertwee, R. G., Gill, E. W., Paton, W. D., Nilsson, I. M., Widman, M. y col. (1974). Relative pharmacological potency in mice of optical isomers of delta 1-tetrahydrocannabinol. *Biochem.Pharmacol.*, 23, 439-446.

- Jones, R. T., Benowitz, N. L. y Herning, R. I. (1981). Clinical relevance of cannabis tolerance and dependence. *J Clin.Pharmacol.*, 21, 143S-152S.
- Jordan, J. D., Carey, K. D., Stork, P. J. y Iyengar, R. (1999). Modulation of rap activity by direct interaction of Galpha(o) with Rap1 GTPase-activating protein. *J.biol.Chem.*, 274, 21507-21510.
- Juan-Picó, P., Fuentes, E., Bermúdez-Silva, F. J., Javier Díaz-Molina, F., Ripoll, C., Rodríguez de Fonseca, F. y col. (2006). Cannabinoid receptors regulate Ca^{2+} signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium*, 39, 155-162.
- Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T. y col. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neoendorphin/dynorphin precursor. *Nature*, 298, 245-249.
- Kalb, R. G. y Fox, A. J. (1997). Synchronized overproduction of AMPA, kainate, and NMDA glutamate receptors during human spinal cord development. *J.Comp Neurol.*, 384, 200-210.
- Kalia, L. V. y Salter, M. W. (2003). Interactions between Src family protein tyrosine kinases and PSD-95. *Neuropharmacology*, 45, 720-728.
- Karsak, M., Ofek, O., Fogel, M., Wright, K., Tam, J., Gabet, Y. y col. (2004). The cannabinoid CB2 receptor: a potential target for the treatment of osteoporosis. *J.Bone Miner.Res.*, 19, S383.
- Katona, I., Sperlagh, B., Sik, A., Kafalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K. y col. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci.*, 19, 4544-4558.
- Kennedy, M. B. (2000). Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*, 290, 750-754.
- Kieffer, B. L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C. y Hirth, C. G. (1992). The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 89, 12048-12052.
- Kieffer, B. L. y Gaveriaux-Ruff, C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol.*, 66, 285-306.
- Kijas, A. W., Harris, J. L., Harris, J. M. y Lavin, M. F. (2006). Aprataxin forms a discrete branch in the HIT (histidine triad) superfamily of proteins with both DNA/RNA binding and nucleotide hydrolase activities. *J.biol.Chem.*, 281, 13939-13948.
- Kim, E. y Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat.Rev.Neurosci.*, 5, 771-781.
- Kim, J. H., Liao, D., Lau, L. F. y Huganir, R. L. (1998). SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron*, 20, 683-691.

- Kim, K. S., Lee, K. W., Lee, K. W., Im, J. Y., Yoo, J. Y., Kim, S. W. y col. (2006a). Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 103, 3908-3913.
- Kim, S. H., Won, S. J., Mao, X. O., Jin, K. y Greenberg, D. A. (2006b). Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol.Pharmacol.*, 69, 691-696.
- Klauck, T. M., Faux, M. C., Labudda, K., Langeberg, L. K., Jaken, S. y Scott, J. D. (1996). Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science*, 271, 1589-1592.
- Klein, M. G., Yao, Y., Slosberg, E. D., Lima, C. D., Doki, Y. y Weinstein, I. B. (1998). Characterization of PKCI and comparative studies with FHIT, related members of the HIT protein family. *Exp.Cell Res*, 244, 26-32.
- Knapp, R. J., Malatynska, E., Fang, L., Li, X., Babin, E., Nguyen, M. y col. (1994). Identification of a human delta opioid receptor: cloning and expression. *Life Sci.*, 54, L463-L469.
- Koch, T., Schulz, S., Pfeiffer, M., Klutzny, M., Schröder, H., Kahl, E. y col. (2001). C-terminal splice variants of the mouse mu-opioid receptor differ in morphine-induced internalization and receptor resensitization. *J.biol.Chem.*, 276, 31408-31414.
- Koch, T., Widera, A., Bartsch, K., Schulz, S., Brandenburg, L. O., Wundrack, N. y col. (2005). Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol.Pharmacol.*, 67, 280-287.
- Köfalvi, A., Rodrigues, R. J., Ledent, C., Mackie, K., Vizi, E. S., Cunha, R. A. y col. (2005). Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J.Neurosci.*, 25, 2874-2884.
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H. y col. (1993). Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, 364, 249-252.
- Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. y Seeburg, P. H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, 269, 1737-1740.
- Kornetsky, C. y Bain, G. (1968). Morphine: single-dose tolerance. *Science*, 162, 1011-1012.
- Kosterlitz, H. W. y Waterfield, A. A. (1975). In vitro models in the study of structure-activity relationships of narcotic analgesics. *Annu.Rev.Pharmacol.*, 15, 29-47.
- Kotecha, S. A., Jackson, M. F., Al-Mahrouki, A., Roder, J. C., Orser, B. A. y MacDonald, J. F. (2003). Co-stimulation of mGluR5 and N-methyl-D-aspartate receptors is required for potentiation of excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons. *J.biol.Chem.*, 278, 27742-27749.

- Kotecha, S. A. y MacDonald, J. F. (2003). Signaling molecules and receptor transduction cascades that regulate NMDA receptor-mediated synaptic transmission. *Int.Rev.Neurobiol.*, 54, 51-106.
- Kotecha, S. A., Oak, J. N., Jackson, M. F., Perez, Y., Orser, B. A., Van Tol, H. H. y col. (2002). A D2 class dopamine receptor transactivates a receptor tyrosine kinase to inhibit NMDA receptor transmission. *Neuron*, 35, 1111-1122.
- Kovoor, A., Henry, D. J. y Chavkin, C. (1995). Agonist-induced desensitization of the mu opioid receptor-coupled potassium channel (GIRK1). *J.biol.Chem.*, 270, 589-595.
- Kozasa, T. y Gilman, A. G. (1995). Purification of recombinant G proteins from Sf9 cells by hexahistidine tagging of associated subunits. Characterization of alpha 12 and inhibition of adenylyl cyclase by alpha z. *J.biol.Chem.*, 270, 1734-1741.
- Krupnick, J. G. y Benovic, J. L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 38, 289-319.
- Kuner, T., Wollmuth, L. P., Karlin, A., Seeburg, P. H. y Sakmann, B. (1996). Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron*, 17, 343-352.
- Laube, B., Kuhse, J. y Betz, H. (1998). Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J.Neurosci.*, 18, 2954-2961.
- Lauckner, J. E., Hille, B. y Mackie, K. (2005). The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 102, 19144-19149.
- Law, P. Y., Wong, Y. H. y Loh, H. H. (2000). Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 40, 389-430.
- Lawrence, D. K. y Hill, E. W. (1975). The effects of delta1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Mol.Pharmacol.*, 11, 595-602.
- Lee, F. J., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chery, N., Wang, Y. y col. (2002). Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*, 111, 219-230.
- Lee, M. C., Smith, F. L., Stevens, D. L. y Welch, S. P. (2003). The role of several kinases in mice tolerant to delta 9-tetrahydrocannabinol. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 305, 593-599.
- Lee, R. H., Ting, T. D., Lieberman, B. S., Tobias, D. E., Lolley, R. N. y Ho, Y. K. (1992). Regulation of retinal cGMP cascade by phosducin in bovine rod photoreceptor cells. Interaction of phosducin and transducin. *J.biol.Chem.*, 267, 25104-25112.
- Lefkowitz, R. J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J.biol.Chem.*, 273, 18677-18680.

- Lefkowitz, R. J. y Shenoy, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308, 512-517.
- Leicht, D. T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M. y col. (2007). Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim.Biophys.Acta*, 1773, 1196-1212.
- Leonard, A. S., Lim, I. A., Hemsworth, D. E., Horne, M. C. y Hell, J. W. (1999). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 3239-3244.
- Li, C. H. y Chung, D. (1976). Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 73, 1145-1148.
- Li, H., Zhang, Y., Su, T., Santella, R. M. y Weinstein, I. B. (2006). Hint1 is a haplo-insufficient tumor suppressor in mice. *Oncogene*, 25, 713-721.
- Li, J. G., Luo, L. Y., Krupnick, J. G., Benovic, J. L. y Liu-Chen, L. Y. (1999). U50,488H-induced internalization of the human kappa opioid receptor involves a beta-arrestin- and dynamin-dependent mechanism. Kappa receptor internalization is not required for mitogen-activated protein kinase activation. *J.biol.Chem.*, 274, 12087-12094.
- Li, Q., Yan, H., Wilson, W. A. y Swartzwelder, H. S. (2010). Modulation of NMDA and AMPA-mediated synaptic transmission by CB1 receptors in frontal cortical pyramidal cells. *Brain Res*, 1342, 127-137.
- Lichtman, A. H., Cook, S. A. y Martin, B. R. (1996). Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 276, 585-593.
- Lichtman, A. H. y Martin, B. R. (1991). Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 258, 517-523.
- Lichtman, A. H. y Martin, B. R. (1997). The selective cannabinoid antagonist SR 141716A blocks cannabinoid-induced antinociception in rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 57, 7-12.
- Lim, G., Sung, B., Ji, R. R. y Mao, J. (2003). Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats. *Pain*, 105, 275-283.
- Lima, C. D., Klein, M. G. y Hendrickson, W. A. (1997). Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family. *Science*, 278, 286-290.
- Lima, C. D., Klein, M. G., Weinstein, I. B. y Hendrickson, W. A. (1996). Three-dimensional structure of human protein kinase C interacting protein 1, a member of the HIT family of proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 5357-5362.
- Lipton, S. A. (2006). Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat.Rev.Drug Discov.*, 5, 160-170.

- Lisman, J., Schulman, H. y Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat.Rev.Neurosci.*, 3, 175-190.
- Liu, H. C., Lu, S., Augustin, L. B., Felsheim, R. F., Chen, H. C., Loh, H. H. y col. (1995). Cloning and promoter mapping of mouse kappa opioid receptor gene. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 209, 639-647.
- Liu, Q., Bhat, M., Bowen, W. D. y Cheng, J. (2009). Signaling pathways from cannabinoid receptor-1 activation to inhibition of N-methyl-D-aspartic acid mediated calcium influx and neurotoxicity in dorsal root ganglion neurons. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 331, 1062-1070.
- Liu, Q., Puche, A. C. y Wang, J. B. (2008). Distribution and expression of protein kinase C interactive protein (PKCI/HINT1) in mouse central nervous system (CNS). *Neurochem.Res*, 33, 1263-1276.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, 248, 1547-1550.
- Lord, J. A., Waterfield, A. A., Hughes, J. y Kosterlitz, H. W. (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature*, 267, 495-499.
- Lu, W. Y., Xiong, Z. G., Lei, S., Orser, B. A., Dudek, E., Browning, M. D. y col. (1999). G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. *Nat.Neurosci.*, 2, 331-338.
- Lukov, G. L., Baker, C. M., Ludtke, P. J., Hu, T., Carter, M. D., Hackett, R. A. y col. (2006). Mechanism of assembly of G protein betagamma subunits by protein kinase CK2-phosphorylated phosducin-like protein and the cytosolic chaperonin complex. *J.biol.Chem.*, 281, 22261-22274.
- Lukov, G. L., Hu, T., McLaughlin, J. N., Hamm, H. E. y Willardson, B. M. (2005). Phosducin-like protein acts as a molecular chaperone for G protein betagamma dimer assembly. *EMBO J.*, 24, 1965-1975.
- Ma, Y. C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W. y Huang, X. Y. (2000). Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell*, 102, 635-646.
- Machelska, H., Labuz, D., Przewlocki, R. y Przewlocka, B. (1997). Inhibition of nitric oxide synthase enhances antinociception mediated by mu, delta and kappa opioid receptors in acute and prolonged pain in the rat spinal cord. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 282, 977-984.
- Mackie, K., Devane, W. A. y Hille, B. (1993). Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol.Pharmacol.*, 44, 498-503.
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R. y Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci.*, 15, 6552-6561.

- Madry, C., Mesic, I., Bartholomaeus, I., Nicke, A., Betz, H. y Laube, B. (2007). Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 354, 102-108.
- Makhinson, M., Chotiner, J. K., Watson, J. B. y O'Dell, T. J. (1999). Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation. *J.Neurosci.*, 19, 2500-2510.
- Makman, M. H., Bilfinger, T. V. y Stefano, G. B. (1995). Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. *J.Immunol.*, 154, 1323-1330.
- Mansbach, R. S., Rovetti, C. C., Winston, E. N. y Lowe, J. A., III (1996). Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A on the behavior of pigeons and rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 124, 315-322.
- Mansour, A., Fox, C. A., Akil, H. y Watson, S. J. (1995a). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.*, 18, 22-29.
- Mansour, A., Hoversten, M. T., Taylor, L. P., Watson, S. J. y Akil, H. (1995b). The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain Res*, 700, 89-98.
- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M. E., Akil, H. y Watson, S. J. (1988). Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci.*, 11, 308-314.
- Mansson, E., Bare, L. y Yang, D. (1994). Isolation of a human kappa opioid receptor cDNA from placenta. *Biochem.biophys.Res.Comm.*, 202, 1431-1437.
- Mao, H., Zhao, Q., Daigle, M., Ghahremani, M. H., Chidiac, P. y Albert, P. R. (2004). RGS17/RGSZ2, a novel regulator of Gi/o, Gz, and Gq signaling. *J.biol.Chem.*, 279, 26314-26322.
- Marchalant, Y., Cerbai, F., Brothers, H. M. y Wenk, G. L. (2008). Cannabinoid receptor stimulation is anti-inflammatory and improves memory in old rats. *Neurobiol.Aging*, 29, 1894-1901.
- Marinissen, M. J. y Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol.Sci.*, 22, 368-376.
- Martin, B. R., Welch, S. P. y Abood, M. (1994). Progress toward understanding the cannabinoid receptor and its second messenger systems. *Adv.Pharmacol.*, 25, 341-397.
- Martin, W. J., Loo, C. M. y Basbaum, A. I. (1999). Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation. *Pain*, 82, 199-205.
- Martin, W. R., Eades, C. G., Thompson, J. A., Huppler, R. E. y Gilbert, P. E. (1976). The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 197, 517-532.

- Martini, L., Waldhoer, M., Pusch, M., Kharazia, V., Fong, J., Lee, J. H. y col. (2007). Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASPI. *FASEB J*, 21, 802-811.
- Massotte, D., Brillet, K., Kieffer, B. y Milligan, G. (2002). Agonists activate Gi1 alpha or Gi2 alpha fused to the human mu opioid receptor differently. *J.Neurochem.*, 81, 1372-1382.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. y Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346, 561-564.
- Mayer, M. L. (2006). Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature*, 440, 456-462.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L. y Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309, 261-263.
- McCullar, J. S., Larsen, S. A., Millimaki, R. A. y Filtz, T. M. (2003). Calmodulin is a phospholipase C-beta interacting protein. *J.biol.Chem.*, 278, 33708-33713.
- McCullar, J. S., Malencik, D. A., Vogel, W. K., Crofoot, K. M., Anderson, S. R. y Filtz, T. M. (2007). Calmodulin potentiates G beta gamma activation of phospholipase C-beta3. *Biochem.Pharmacol.*, 73, 270-278.
- McDonald, J. R. y Walsh, M. P. (1985). Ca^{2+} -binding proteins from bovine brain including a potent inhibitor of protein kinase C. *Biochem.J.*, 232, 559-567.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R. y col. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem.Pharmacol.*, 50, 83-90.
- Meddows, E., Le, B. B., Grimwood, S., Wafford, K., Sandhu, S., Whiting, P. y col. (2001). Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. *J.biol.Chem.*, 276, 18795-18803.
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J.Nutr.*, 130, 1007S-1015S.
- Melis, M., Pistis, M., Perra, S., Muntoni, A. L., Pillolla, G. y Gessa, G. L. (2004). Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *J.Neurosci.*, 24, 53-62.
- Meng, J., Glick, J. L., Polakis, P. y Casey, P. J. (1999). Functional interaction between Galpha(z) and Rap1GAP suggests a novel form of cellular cross-talk. *J.biol.Chem.*, 274, 36663-36669.
- Miles, M. F., Barhite, S., Sganga, M. y Elliott, M. (1993). Phosducin-like protein: an ethanol-responsive potential modulator of guanine nucleotide-binding protein function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 90, 10831-10835.

- Min, B. H., Augustin, L. B., Felsheim, R. F., Fuchs, J. A. y Loh, H. H. (1994). Genomic structure analysis of promoter sequence of a mouse mu opioid receptor gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 91, 9081-9085.
- Mizoguchi, H., Watanabe, C., Yonezawa, A. y Sakurada, S. (2009). New therapy for neuropathic pain. *Int.Rev.Neurobiol.*, 85, 249-260.
- Mochizuki, N., Ohba, Y., Kiyokawa, E., Kurata, T., Murakami, T., Ozaki, T. y col. (1999). Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha(i). *Nature*, 400, 891-894.
- Molina-Holgado, E., Vela, J. M., Arévalo-Martín, A., Almazán, G., Molina-Holgado, F., Borrell, J. y col. (2002). Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci.*, 22, 9742-9753.
- Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J. L., Moisand, C., Chalon, P. y col. (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.*, 341, 33-38.
- Morre, M., Bachy, A., Gout, B., Boigegrain, R., Arnone, M. y Roncucci, R. (1983). Kappa binding sites in guinea-pig brain membranes: evidence for a dynorphin-resistant subtype. *Life Sci.*, 33 Suppl 1, 179-182.
- Mukhopadhyay, S., Shim, J. Y., Assi, A. A., Norford, D. y Howlett, A. C. (2002). CB(1) cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling. *Chem.Phys.Lipids*, 121, 91-109.
- Munro, S., Thomas, K. L. y bu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61-65.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K. y Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat.Biotechnol.*, 20, 87-90.
- Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J. y col. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*, 23, 569-582.
- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A. C., Cohen, S. N. y col. (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature*, 278, 423-427.
- Narita, M., Hashimoto, K., Amano, T., Narita, M., Niikura, K., Nakamura, A. y col. (2008). Post-synaptic action of morphine on glutamatergic neuronal transmission related to the descending antinociceptive pathway in the rat thalamus. *J.Neurochem.*, 104, 469-478.
- Narita, M., Mizoguchi, H., Khotib, J., Suzuki, M., Ozaki, S., Yajima, Y. y col. (2002). Influence of a deletion of protein kinase C gamma isoform in the G-protein activation mediated through opioid receptor-like-1 and mu-opioid receptors in the mouse pons/medulla. *Neurosci.Lett.*, 331, 5-8.

- Narita, M., Mizoguchi, H., Suzuki, T., Narita, M., Dun, N. J., Imai, S. y col. (2001). Enhanced mu-opioid responses in the spinal cord of mice lacking protein kinase Cgamma isoform. *J.biol.Chem.*, 276, 15409-15414.
- Nestler, E. J. y Landsman, D. (2001). Learning about addiction from the genome. *Nature*, 409, 834-835.
- Netzeband, J. G., Conroy, S. M., Parsons, K. L. y Gruol, D. L. (1999). Cannabinoids enhance NMDA-elicited Ca^{2+} signals in cerebellar granule neurons in culture. *J.Neurosci.*, 19, 8765-8777.
- Neubig, R. R. (2002). Regulators of G protein signaling (RGS proteins): novel central nervous system drug targets. *J.Pept.Res.*, 60, 312-316.
- New, D. C., Wu, K., Kwok, A. W. y Wong, Y. H. (2007). G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis. *FEBS J.*, 274, 6025-6036.
- Newton, A. C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 9, 161-167.
- Nishi, M., Takeshima, H., Mori, M., Nakagawara, K. y Takeuchi, T. (1994). Structure and chromosomal mapping of genes for the mouse kappa-opioid receptor and an opioid receptor homologue (MOR-C). *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 205, 1353-1357.
- Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S. y col. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature*, 295, 202-206.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbert, A. y Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307, 462-465.
- Nunn, C., Mao, H., Chidiac, P. y Albert, P. R. (2006). RGS17/RGSZ2 and the RZ/A family of regulators of G-protein signaling. *Semin.Cell Dev.Biol.*, 17, 390-399.
- O'Shea, M., Singh, M. E., McGregor, I. S. y Mallet, P. E. (2004). Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J.Psychopharmacol.*, 18, 502-508.
- Ohnishi, T., Saito, K., Maeda, S., Matsumoto, K., Sakuda, M. y Inoki, R. (1990). Intracerebroventricular treatment of mice with pertussis toxin induces hyperalgesia and enhances 3H-nitrendipine binding to synaptic membranes: similarity with morphine tolerance. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, 341, 123-127.
- Okabe, S., Miwa, A. y Okado, H. (1999). Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *J.Neurosci.*, 19, 7781-7792.
- Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J. P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P. A. y col. (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1074, 514-536.
- Ong, W. Y. y Mackie, K. (1999). A light and electron microscopic study of the CB1 cannabinoid receptor in primate brain. *Neuroscience*, 92, 1177-1191.

Overton, H. A., Babbs, A. J., Doel, S. M., Fyfe, M. C., Gardner, L. S., Griffin, G. y col. (2006). Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab*, 3, 167-175.

Oviedo, A., Glowa, J. y Herkenham, M. (1993). Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res*, 616, 293-302.

Palazzo, E., de Novellis, V., Marabese, I., Rossi, F. y Maione, S. (2006). Metabotropic glutamate and cannabinoid receptor crosstalk in periaqueductal grey pain processing. *Curr.Neuropharmacol.*, 4, 225-231.

Palazzo, E., Marabese, I., de Novellis, V., Oliva, P., Rossi, F., Berrino, L. y col. (2001). Metabotropic and NMDA glutamate receptors participate in the cannabinoid-induced antinociception. *Neuropharmacology*, 40, 319-326.

Palmer, G. C. (2001). Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. *Curr.Drug Targets.*, 2, 241-271.

Pan, Y. X. y Pasternak, G. W. (2011). Molecular Biology of Mu Opioid Receptors The Opiate Receptors. In G.W.Pasternak (Ed.), (23 ed., pp. 121-160). Humana Press.

Parsons, C. G. y Headley, P. M. (1989). On the selectivity of intravenous mu- and kappa-opioids between nociceptive and non-nociceptive reflexes in the spinalized rat. *Br.J.Pharmacol.*, 98, 544-551.

Pasternak, G. W. (1982). High and low affinity opioid binding sites: relationship to mu and delta sites. *Life Sci.*, 31, 1303-1306.

Pasternak, G. W. y Wood, P. J. (1986). Multiple mu opiate receptors. *Life Sci.*, 38, 1889-1898.

Pearson, J. D., DeWald, D. B., Mathews, W. R., Mozier, N. M., Zurcher-Neely, H. A., Heinrichson, R. L. y col. (1990). Amino acid sequence and characterization of a protein inhibitor of protein kinase C. *J.biol.Chem.*, 265, 4583-4591.

Pei, L., Lee, F. J., Moszczynska, A., Vukusic, B. y Liu, F. (2004). Regulation of dopamine D1 receptor function by physical interaction with the NMDA receptors. *J.Neurosci.*, 24, 1149-1158.

Pérez-Otano, I., Schulteis, C. T., Contractor, A., Lipton, S. A., Trimmer, J. S., Sucher, N. J. y col. (2001). Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J.Neurosci.*, 21, 1228-1237.

Perroy, J., Raynaud, F., Homburger, V., Rousset, M. C., Telley, L., Bockaert, J. y col. (2008). Direct interaction enables cross-talk between ionotropic and group I metabotropic glutamate receptors. *J.biol.Chem.*, 283, 6799-6805.

Pert, C. B. y Snyder, S. H. (1973). Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*, 179, 1011-1014.

- Pertwee, R. G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol.Ther.*, 74, 129-180.
- Petralia, R. S., Wang, Y. X. y Wenthold, R. J. (1994a). The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *J.Neurosci.*, 14, 6102-6120.
- Petralia, R. S., Yokotani, N. y Wenthold, R. J. (1994b). Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J.Neurosci.*, 14, 667-696.
- Petrenko, A. B., Yamakura, T., Baba, H. y Shimoji, K. (2003). The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth.Analg.*, 97, 1108-1116.
- Pettit, D. A., Harrison, M. P., Olson, J. M., Spencer, R. F. y Cabral, G. A. (1998). Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci.Res.*, 51, 391-402.
- Pitcher, J. A., Hall, R. A., Daaka, Y., Zhang, J., Ferguson, S. S., Hester, S. y col. (1998). The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin. *J.biol.Chem.*, 273, 12316-12324.
- Prybylowski, K., Chang, K., Sans, N., Kan, L., Vicini, S. y Wenthold, R. J. (2005). The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron*, 47, 845-857.
- Puig, M. y Montes, A. (1998). Opioids: From receptors to clinical application. *Current Pain and Headache Reports*, 2, 234-241.
- Rao, G. K. y Kaminski, N. E. (2006). Cannabinoid-mediated elevation of intracellular calcium: a structure-activity relationship. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 317, 820-829.
- Rea, K., Roche, M. y Finn, D. P. (2007). Supraspinal modulation of pain by cannabinoids: the role of GABA and glutamate. *Br.J.Pharmacol.*, 152, 633-648.
- Reig, J. A., Yu, L. y Klein, D. C. (1990). Pineal transduction. Adrenergic-cyclic AMP-dependent phosphorylation of cytoplasmic 33-kDa protein (MEKA) which binds beta gamma-complex of transducin. *J.biol.Chem.*, 265, 5816-5824.
- Rice, A. S., Farquhar-Smith, W. P. y Nagy, I. (2002). Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, 66, 243-256.
- Richardson, J. D., Aanonsen, L. y Hargreaves, K. M. (1998). Hypoactivity of the spinal cannabinoid system results in NMDA-dependent hyperalgesia. *J.Neurosci.*, 18, 451-457.
- Robillard, L., Ethier, N., Lachance, M. y Hebert, T. E. (2000). Gbetagamma subunit combinations differentially modulate receptor and effector coupling in vivo. *Cell Signal.*, 12, 673-682.

Roche, K. W., Tu, J. C., Petralia, R. S., Xiao, B., Wenthold, R. J. y Worley, P. F. (1999). Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors. *J.biol.Chem.*, 274, 25953-25957.

Roche, S., Fumagalli, S. y Courtneidge, S. A. (1995). Requirement for Src family protein tyrosine kinases in G2 for fibroblast cell division. *Science*, 269, 1567-1569.

Rodríguez, J. J., Mackie, K. y Pickel, V. M. (2001). Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J.Neurosci.*, 21, 823-833.

Rodríguez-Muñoz, M., Bermúdez, D., Sánchez-Blázquez, P. y Garzón, J. (2007a). Sumoylated RGS-Rz proteins act as scaffolds for Mu-opioid receptors and G-protein complexes in mouse brain. *Neuropsychopharmacology*, 32, 842-850.

Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E., Gaitán, G., Sánchez-Blázquez, P. y Garzón, J. (2007b). RGS14 prevents morphine from internalizing Mu-opioid receptors in periaqueductal gray neurons. *Cell Signal.*, 19, 2558-2571.

Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E., Sánchez-Blázquez, P. y Garzón, J. (2007c). Morphine induces endocytosis of neuronal mu-opioid receptors through the sustained transfer of Galpha subunits to RGSZ2 proteins. *Mol.Pain*, 3, 19.

Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E., Sánchez-Blázquez, P. y Garzón, J. (2011). NO-released zinc supports the simultaneous binding of Raf-1 and PKCgamma cysteine-rich domains to HINT1 protein at the mu-opioid receptor. *Antioxid.Redox.Signal.*, 14, 2413-2425.

Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E., Sánchez-Blázquez, P., Wang, J. B. y Garzón, J. (2008). NMDAR-nNOS generated zinc recruits PKCgamma to the HINT1-RGS17 complex bound to the C terminus of Mu-opioid receptors. *Cell Signal.*, 20, 1855-1864.

Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Vicente-Sánchez, A., Bailón, C., Martín-Aznar, B. y Garzón, J. (2010). The histidine triad nucleotide-binding protein 1 supports mu-opioid receptor-glutamate NMDA receptor cross-regulation. *Cell Mol.Life Sci.*

Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Vicente-Sánchez, A., Berrocoso, E. y Garzón, J. (2012). The Mu-Opioid Receptor and the NMDA Receptor Associate in PAG Neurons: Implications in Pain Control. *Neuropsychopharmacology*, 37, 338-349.

Romero, J., García-Palomero, E., Castro, J. G., García-Gil, L., Ramos, J. A. y Fernández-Ruiz, J. J. (1997). Effects of chronic exposure to delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, 46, 100-108.

Ross, E. M. y Wilkie, T. M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu.Rev.Biochem.*, 69, 795-827.

- Rubino, T., Forlani, G., Viganò, D., Zippel, R. y Parolaro, D. (2004). Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Mol.Cell Neurosci.*, 25, 355-362.
- Rubino, T., Patrini, G., Parenti, M., Massi, P. y Parolaro, D. (1997). Chronic treatment with a synthetic cannabinoid CP-55,940 alters G-protein expression in the rat central nervous system. *Brain Res Mol.Brain Res*, 44, 191-197.
- Rubino, T., Viganò, D., Costa, B., Colleoni, M. y Parolaro, D. (2000a). Loss of cannabinoid-stimulated guanosine 5'-O-(3-[³⁵S]Thiotriphosphate) binding without receptor down-regulation in brain regions of anandamide-tolerant rats. *J.Neurochem.*, 75, 2478-2484.
- Rubino, T., Viganò, D., Massi, P., Spinello, M., Zagato, E., Giagnoni, G. y col. (2000b). Chronic delta-9-tetrahydrocannabinol treatment increases cAMP levels and cAMP-dependent protein kinase activity in some rat brain regions. *Neuropharmacology*, 39, 1331-1336.
- Rubino, T., Viganò, D., Premoli, F., Castiglioni, C., Bianchessi, S., Zippel, R. y col. (2006). Changes in the expression of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins in mouse brain during cannabinoid tolerance: a role for RAS-ERK cascade. *Mol.Neurobiol.*, 33, 199-213.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J. y col. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br.J Pharmacol.*, 152, 1092-1101.
- Ryberg, E., Vu, H. K., Larsson, N., Groblewski, T., Hjorth, S., Elebring, T. y col. (2005). Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Lett.*, 579, 259-264.
- Saito, N. y Shirai, Y. (2002). Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. *J.Biochem.*, 132, 683-687.
- Salio, C., Doly, S., Fischer, J., Franzoni, M. F. y Conrath, M. (2002). Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci.Lett.*, 329, 13-16.
- Salio, C., Fischer, J., Franzoni, M. F., Mackie, K., Kaneko, T. y Conrath, M. (2001). CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. *Neuroreport*, 12, 3689-3692.
- Salter, M. W. y Kalia, L. V. (2004). Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat.Rev.Neurosci.*, 5, 317-328.
- Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Canova, C., Brachet, P. y Guzmán, M. (1998). Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett.*, 436, 6-10.
- Sánchez-Blázquez, P., García-España, A. y Garzón, J. (1995). In vivo injection of antisense oligodeoxynucleotides to G alpha subunits and supraspinal analgesia evoked by mu and delta opioid agonists. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 275, 1590-1596.

Sánchez-Blázquez, P., García-España, A. y Garzón, J. (1997). Antisense oligodeoxynucleotides to opioid mu and delta receptors reduced morphine dependence in mice: role of delta-2 opioid receptors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 280, 1423-1431.

Sánchez-Blázquez, P. y Garzón, J. (1998). Delta Opioid receptor subtypes activate inositol-signaling pathways in the production of antinociception. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 285, 820-827.

Sánchez-Blázquez, P., Gómez-Serranillos, P. y Garzón, J. (2001). Agonists determine the pattern of G-protein activation in mu-opioid receptor-mediated supraspinal analgesia. *Brain Res.Bull.*, 54, 229-235.

Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Díaz, M., López-Fando, A., Rodríguez-Muñoz, M. y Garzón, J. (2003). The GBeta5 subunit that associates with the R7 subfamily of RGS proteins regulates mu-opioid effects. *Neuropharmacology*, 45, 82-95.

Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E. y Garzón, J. (2009). Brain-specific Galphaz interacts with Src tyrosine kinase to regulate Mu-opioid receptor-NMDAR signaling pathway. *Cell Signal.*, 21, 1444-1454.

Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M. y Garzón, J. (2010). Mu-opioid receptors transiently activate the Akt-nNOS pathway to produce sustained potentiation of PKC-mediated NMDAR-CaMKII signaling. *PLoS.One.*, 5, e11278.

Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Montero, C., de la Torre-Madrid, E. y Garzón, J. (2008). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II supports morphine antinociceptive tolerance by phosphorylation of glycosylated phosducin-like protein. *Neuropharmacology*, 54, 319-330.

Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Montero, C. y Garzón, J. (2005). RGS-Rz and RGS9-2 proteins control mu-opioid receptor desensitisation in CNS: the role of activated Galphaz subunits. *Neuropharmacology*, 48, 134-150.

Sánchez-Pérez, A. M. y Felipo, V. (2005). Serines 890 and 896 of the NMDA receptor subunit NR1 are differentially phosphorylated by protein kinase C isoforms. *Neurochem.Int.*, 47, 84-91.

Sans, N., Wang, P. Y., Du, Q., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Nakka, S. y col. (2005). mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression. *Nat.Cell Biol.*, 7, 1179-1190.

Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Das, S., Cui, J., Talantova, M. V. y col. (2002). Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J.Neurophysiol.*, 87, 2052-2063.

Scavone, J. L., Mackie, K. y Van Bockstaele, E. J. (2010). Characterization of cannabinoid-1 receptors in the locus coeruleus: relationship with mu-opioid receptors. *Brain Res.*, 1312, 18-31.

Schiller, P. W., Fundytus, M. E., Merovitz, L., Weltrowska, G., Nguyen, T. M., Lemieux, C. y col. (1999). The opioid mu agonist/delta antagonist DIPP-NH₂[Psi] produces a potent

analgesic effect, no physical dependence, and less tolerance than morphine in rats. *J.Med.Chem.*, 42, 3520-3526.

Schlicker, E. y Kathmann, M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol.Sci.*, 22, 565-572.

Schneider, M. y Koch, M. (2003). Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology*, 28, 1760-1769.

Schröder, S. y Lohse, M. J. (1996). Inhibition of G-protein betagamma-subunit functions by phosducin-like protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 2100-2104.

Schulz, K., Danner, S., Bauer, P., Schröder, S. y Lohse, M. J. (1996). Expression of phosducin in a phosducin-negative cell line reveals functions of a Gbetagamma-binding protein. *J.biol.Chem.*, 271, 22546-22551.

Schulz, S., Mayer, D., Pfeiffer, M., Stumm, R., Koch, T. y Höllt, V. (2004). Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375. *EMBO J.*, 23, 3282-3289.

Scott, D. B., Blanpied, T. A., Swanson, G. T., Zhang, C. y Ehlers, M. D. (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J.Neurosci.*, 21, 3063-3072.

Scott, D. B., Michailidis, I., Mu, Y., Logothetis, D. y Ehlers, M. D. (2004). Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. *J.Neurosci.*, 24, 7096-7109.

Seeburg, P. H., Burnashev, N., Köhr, G., Kuner, T., Sprengel, R. y Monyer, H. (1995). The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector. *Recent progress in hormone research*, 50, 19-34.

Shen, K. y Meyer, T. (1999). Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science*, 284, 162-166.

Shen, M., Piser, T. M., Seybold, V. S. y Thayer, S. A. (1996). Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci.*, 16, 4322-4334.

Shen, M. y Thayer, S. A. (1998). Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. *Mol.Pharmacol.*, 54, 459-462.

Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L. A., Jan, Y. N. y Jan, L. Y. (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature*, 368, 144-147.

Shire, D., Carillon, C., Kaghad, M., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le, F. G. y col. (1995). An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol.Chem.*, 270, 3726-3731.

Shyu, Y. J., Suarez, C. D., Liu, H., Deng, X. y Hu, C. D. (2007). Bimolecular Fluorescence complementation (BiFC) and beyond. *Microscopy and Microanalysis*, 13, 348-349.

Sierra, D. A., Gilbert, D. J., Householder, D., Grishin, N. V., Yu, K., Ukidwe, P. y col. (2002). Evolution of the regulators of G-protein signaling multigene family in mouse and human. *Genomics*, 79, 177-185.

Sigtermans, M. J., van Hilten, J. J., Bauer, M. C., Arbous, M. S., Marinus, J., Sarton, E. Y. y col. (2009). Ketamine produces effective and long-term pain relief in patients with Complex Regional Pain Syndrome Type 1. *Pain*, 145, 304-311.

Sim, L. J., Hampson, R. E., Deadwyler, S. A. y Childers, S. R. (1996). Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35 S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci.*, 16, 8057-8066.

Sim-Selley, L. J. y Martin, B. R. (2002). Effect of chronic administration of R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl)methanone mesylate (WIN55,212-2) or delta(9)-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor adaptation in mice. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 303, 36-44.

Sim-Selley, L. J., Schechter, N. S., Rorrer, W. K., Dalton, G. D., Hernández, J., Martin, B. R. y col. (2006). Prolonged recovery rate of CB1 receptor adaptation after cessation of long-term cannabinoid administration. *Mol.Pharmacol.*, 70, 986-996.

Simon, E. J., Hiller, J. M. y Edelman, I. (1973). Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 70, 1947-1949.

Simon, M. I., Strathmann, M. P. y Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, 252, 802-808.

Simonin, F., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., Matthes, H., Nappey, V., Lannes, B. y col. (1994). The human delta-opioid receptor: genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Mol.Pharmacol.*, 46, 1015-1021.

Smart, D., Hirst, R. A., Hirota, K., Grandy, D. K. y Lambert, D. G. (1997). The effects of recombinant rat Mu-opioid receptor activation in CHO cells on phospholipase C, $[Ca^{2+}]_i$ and adenylyl cyclase. *Br.J.Pharmacol.*, 120, 1165-1171.

Smart, D. y Lambert, D. G. (1996). Delta-Opioids stimulate inositol 1,4,5-trisphosphate formation, and so mobilize Ca^{2+} from intracellular stores, in undifferentiated NG108-15 cells. *J.Neurochem.*, 66, 1462-1467.

Smith, F. L., Dombrowski, D. S. y Dewey, W. L. (1999a). Involvement of intracellular calcium in morphine tolerance in mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 62, 381-388.

Smith, F. L., Lohmann, A. B. y Dewey, W. L. (1999b). Involvement of phospholipid signal transduction pathways in morphine tolerance in mice. *Br.J.Pharmacol.*, 128, 220-226.

- Smith, T. H., Sim-Selley, L. J. y Selley, D. E. (2010). Cannabinoid CB1 receptor-interacting proteins: novel targets for central nervous system drug discovery? *Br.J.Pharmacol.*, 160, 454-466.
- Snyder, G. L., Fienberg, A. A., Huganir, R. L. y Greengard, P. (1998). A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J.Neurosci.*, 18, 10297-10303.
- Snyder, S. H. y Pasternak, G. W. (2003). Historical review: Opioid receptors. *Trends Pharmacol.Sci.*, 24, 198-205.
- Sofuoglu, M., Portoghese, P. S. y Takemori, A. E. (1991). Cross-tolerance studies in the spinal cord of beta-FNA-treated mice provides further evidence for delta opioid receptor subtypes. *Life Sci.*, 49, L153-L156.
- Song, I. y Huganir, R. L. (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*, 25, 578-588.
- Stanasila, L., Lim, W. K., Neubig, R. R. y Pattus, F. (2000). Coupling efficacy and selectivity of the human mu-opioid receptor expressed as receptor-Galpa fusion proteins in Escherichia coli. *J.Neurochem.*, 75, 1190-1199.
- Standley, S., Roche, K. W., McCallum, J., Sans, N. y Wenthold, R. J. (2000). PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron*, 28, 887-898.
- Stefano, G. B., Digenis, A., Spector, S., Leung, M. K., Bilfinger, T. V., Makman, M. H. y col. (1993). Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 90, 11099-11103.
- Stein, C. (1993). Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Anesth.Analg.*, 76, 182-191.
- Stein, C. A. y Cheng, Y. C. (1993). Antisense oligonucleotides as therapeutic agents: is the bullet really magical? *Science*, 261, 1004-1012.
- Stewart, P. E. y Hammond, D. L. (1993). Evidence for delta opioid receptor subtypes in rat spinal cord: studies with intrathecal naltriben, cyclic[D-Pen2, D-Pen5] enkephalin and [D-Ala2, Glu4]deltorphan. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 266, 820-828.
- Su, T., Suzui, M., Wang, L., Lin, C. S., Xing, W. Q. y Weinstein, I. B. (2003). Deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1/PKC-interacting protein in mice enhances cell growth and carcinogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 7824-7829.
- Sunayashiki-Kusuzaki, K., Kikuchi, T., Wawrousek, E. F. y Shinohara, T. (1997). Arrestin and phosducin are expressed in a small number of brain cells. *Brain Res Mol.Brain Res*, 52, 112-120.
- Tanowitz, M. y von Zastrow, M. (2003). A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors. *J.biol.Chem.*, 278, 45978-45986.

- Tappe-Theodor, A., Agarwal, N., Katona, I., Rubino, T., Martini, L., Swiercz, J. y col. (2007). A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *J Neurosci.*, 27, 4165-4177.
- Terenius, L. (1973). Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol.Toxicol.(Copenh)*, 32, 317-320.
- Thibault, C., Sganga, M. W. y Miles, M. F. (1997). Interaction of phosducin-like protein with G protein betagamma subunits. *J.biol.Chem.*, 272, 12253-12256.
- Thorat, S. N. y Bhargava, H. N. (1994). Effects of NMDA receptor blockade and nitric oxide synthase inhibition on the acute and chronic actions of delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Brain Res*, 667, 77-82.
- Tingley, W. G., Ehlers, M. D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J. B., Riley, C. T. y col. (1997). Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J.biol.Chem.*, 272, 5157-5166.
- Tingley, W. G., Roche, K. W., Thompson, A. K. y Huganir, R. L. (1993). Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature*, 364, 70-73.
- Tolle, T. R., Berthele, A., Laurie, D. J., Seeburg, P. H. y Zieglgansberger, W. (1995). Cellular and subcellular distribution of NMDAR1 splice variant mRNA in the rat lumbar spinal cord. *Eur.J.Neurosci.*, 7, 1235-1244.
- Torreri, P., Ceccarini, M., Macioce, P. y Petrucci, T. C. (2005). Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology. *Ann.Ist.Super.Sanita*, 41, 437-441.
- Trapaidze, N., Keith, D. E., Cvejic, S., Evans, C. J. y Devi, L. A. (1996). Sequestration of the delta opioid receptor. Role of the C terminus in agonist-mediated internalization. *J.biol.Chem.*, 271, 29279-29285.
- Traynor, J. R. y Elliott, J. (1993). delta-Opioid receptor subtypes and cross-talk with mu-receptors. *Trends Pharmacol.Sci.*, 14, 84-86.
- Trejo, J., Hammes, S. R. y Coughlin, S. R. (1998). Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95, 13698-13702.
- Trujillo, K. A. (2002). The neurobiology of opiate tolerance, dependence and sensitization: mechanisms of NMDA receptor-dependent synaptic plasticity. *Neurotox.Res.*, 4, 373-391.
- Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M. C., Mackie, K. y Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83, 393-411.

- Tu, J. C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J. P., Petralia, R. S., Brakeman, P. y col. (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron*, 23, 583-592.
- Tzavara, E. T., Valjent, E., Firmo, C., Mas, M., Beslot, F., Defer, N. y col. (2000). Cannabinoid withdrawal is dependent upon PKA activation in the cerebellum. *Eur.J.Neurosci.*, 12, 1038-1046.
- Tzavara, E. T., Wade, M. y Nomikos, G. G. (2003). Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: site and mechanism of action. *J Neurosci.*, 23, 9374-9384.
- van der Stelt, M. y Di Marzo, V. (2005). Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular.Med.*, 7, 37-50.
- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K. y col. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, 310, 329-332.
- Varadarajulu, J., Lebar, M., Krishnamoorthy, G., Habelt, S., Lu, J., Bernard, W., I y col. (2011). Increased anxiety-related behaviour in Hint1 knockout mice. *Behav.Brain Res*, 220, 305-311.
- Vawter, M. P., Crook, J. M., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., Weinberger, D. R., Becker, K. G. y col. (2002). Microarray analysis of gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia: a preliminary study. *Schizophr.Res*, 58, 11-20.
- Vawter, M., Weickert, C., Ferran, E., Matsumoto, M., Overman, K., Hyde, T. y col. (2004). Gene Expression of Metabolic Enzymes and a Protease Inhibitor in the Prefrontal Cortex Are Decreased in Schizophrenia. *Neurochemical Research*, 29, 1245-1255.
- Ventayol, P., Busquets, X. y García-Sevilla, J. A. (1997). Modulation of immunoreactive protein kinase C-alpha and beta isoforms and G proteins by acute and chronic treatments with morphine and other opiate drugs in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, 355, 491-500.
- Wagner, J. A., Varga, K., Jarai, Z. y Kunos, G. (1999). Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension*, 33, 429-434.
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E. y Whistler, J. L. (2004). Opioid receptors. *Annu.Rev.Biochem.*, 73, 953-990.
- Walker, J. M. y Huang, S. M. (2002b). Cannabinoid analgesia. *Pharmacol.Ther.*, 95, 127-135.
- Walker, J. M. y Huang, S. M. (2002a). Endocannabinoids in pain modulation. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, 66, 235-242.
- Walker, J. M., Huang, S. M., Strangman, N. M., Tsou, K. y Sañudo-Peña, M. C. (1999). Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 12198-12203.

Wang, H., Gracy, K. N. y Pickel, V. M. (1999). Mu-opioid and NMDA-type glutamate receptors are often colocalized in spiny neurons within patches of the caudate-putamen nucleus. *J.Comp Neurol.*, 412, 132-146.

Wang, H. L. (2000). A cluster of Ser/Thr residues at the C-terminus of mu-opioid receptor is required for G protein-coupled receptor kinase 2-mediated desensitization. *Neuropharmacology*, 39, 353-363.

Wang, H. L., Chang, W. T., Hsu, C. Y., Huang, P. C., Chow, Y. W. y Li, A. H. (2002). Identification of two C-terminal amino acids, Ser(355) and Thr(357), required for short-term homologous desensitization of mu-opioid receptors. *Biochem.Pharmacol.*, 64, 257-266.

Wang, J., Tu, Y., Woodson, J., Song, X. y Ross, E. M. (1997). A GTPase-activating protein for the G protein Galphaz. Identification, purification, and mechanism of action. *J.biol.Chem.*, 272, 5732-5740.

Wang, J. B., Johnson, P. S., Persico, A. M., Hawkins, A. L., Griffin, C. A. y Uhl, G. R. (1994). Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett.*, 338, 217-222.

Wang, L., Zhang, Y., Li, H., Xu, Z., Santella, R. M. y Weinstein, I. B. (2007). Hint1 inhibits growth and activator protein-1 activity in human colon cancer cells. *Cancer Res*, 67, 4700-4708.

Weiske, J. y Huber, O. (2005). The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *J.Cell Sci.*, 118, 3117-3129.

Welch, S. P. (1997). Characterization of anandamide-induced tolerance: comparison to delta 9-THC-induced interactions with dynorphinergic systems. *Drug Alcohol Depend.*, 45, 39-45.

Welch, S. P. y Olson, K. G. (1991). Opiate tolerance-induced modulation of free intracellular calcium in synaptosomes. *Life Sci.*, 48, 1853-1861.

Wells, J. L., Bartlett, J. L., Ananthan, S. y Bilsky, E. J. (2001). In vivo pharmacological characterization of SoRI 9409, a nonpeptidic opioid mu-agonist/delta-antagonist that produces limited antinociceptive tolerance and attenuates morphine physical dependence. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 297, 597-605.

Westphal, R. S., Tavalin, S. J., Lin, J. W., Alto, N. M., Fraser, I. D., Langeberg, L. K. y col. (1999). Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science*, 285, 93-96.

Williams, J. T., Christie, M. J. y Manzoni, O. (2001). Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev.*, 81, 299-343.

Wyszynski, M., Lin, J., Rao, A., Nigh, E., Beggs, A. H., Craig, A. M. y col. (1997). Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature*, 385, 439-442.

- Xie, G. X., Meng, F., Mansour, A., Thompson, R. C., Hoversten, M. T., Goldstein, A. y col. (1994). Primary structure and functional expression of a guinea pig kappa opioid (dynorphin) receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 91, 3779-3783.
- Xu, J., Wu, D., Slepak, V. Z. y Simon, M. I. (1995). The N terminus of phosducin is involved in binding of beta gamma subunits of G protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92, 2086-2090.
- Yaka, R., Thornton, C., Vagts, A. J., Phamluong, K., Bonci, A. y Ron, D. (2002). NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99, 5710-5715.
- Yakovlev, A. G., Krueger, K. E. y Faden, A. I. (1995). Structure and expression of a rat kappa opioid receptor gene. *J.biol.Chem.*, 270, 6421-6424.
- Yao, Y. y Mayer, M. L. (2006). Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *J.Neurosci.*, 26, 4559-4566.
- Yoburn, B. C., Gomes, B. A., Rajashekara, V., Patel, C. y Patel, M. (2003). Role of G(i)alpha2-protein in opioid tolerance and mu-opioid receptor downregulation in vivo. *Synapse*, 47, 109-116.
- Yoshida, T., Willardson, B. M., Wilkins, J. F., Jensen, G. J., Thornton, B. D. y Bitensky, M. W. (1994). The phosphorylation state of phosducin determines its ability to block transducin subunit interactions and inhibit transducin binding to activated rhodopsin. *J.biol.Chem.*, 269, 24050-24057.
- Yu, X. M., Askalan, R., Keil, G. J. y Salter, M. W. (1997). NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science*, 275, 674-678.
- Zadina, J. E., Hackler, L., Ge, L. J. y Kastin, A. J. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature*, 386, 499-502.
- Zeitz, K. P., Malmberg, A. B., Gilbert, H. y Basbaum, A. I. (2001). Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKC gamma mutant mice. *Pain*, 94, 245-253.
- Zhang, J. y Chen, C. (2008). Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons by limiting COX-2 elevation. *J Biol.Chem.*, 283, 22601-22611.
- Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Bodduluri, S. R., Laporte, S. A., Law, P. Y. y col. (1998). Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95, 7157-7162.
- Zhu, Y., King, M. A., Schuller, A. G., Nitsche, J. F., Reidl, M., Elde, R. P. y col. (1999). Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron*, 24, 243-252.
- Zoratti, C., Kipmen-Korgun, D., Osibow, K., Malli, R. y Graier, W. F. (2003). Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br.J.Pharmacol.*, 140, 1351-1362.

Zou, X., Lin, Q. y Willis, W. D. (2004). Effect of protein kinase C blockade on phosphorylation of NR1 in dorsal horn and spinothalamic tract cells caused by intradermal capsaicin injection in rats. *Brain Res.*, 1020, 95-105.

Zukin, R. S. y Bennett, M. V. (1995). Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.*, 18, 306-313.

Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sjørgård, M., Di Marzo, V. y col. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400, 452-457.

Publicaciones

